



**You have downloaded a document from
RE-BUS
repository of the University of Silesia in Katowice**

Title: Bioróżnorodność grzybów mikoryzy arbuskularnej i ich wpływ na wzrost roślin w środowisku zanieczyszczonym toksycznymi związkami organicznymi

Author: Monika Malicka

Citation style: Malicka Monika. (2020). Bioróżnorodność grzybów mikoryzy arbuskularnej i ich wpływ na wzrost roślin w środowisku zanieczyszczonym toksycznymi związkami organicznymi. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersytet ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

Wydział Nauk Przyrodniczych
Uniwersytet Śląski w Katowicach

MONIKA MALICKA

PRACA DOKTORSKA

**Bioróżnorodność grzybów mikoryzy arbuskularnej i ich wpływ
na wzrost roślin w środowisku zanieczyszczonym toksycznymi
związkami organicznymi**

Praca doktorska wykonana
w Instytucie Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
Wydziału Nauk Przyrodniczych
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Promotor:
Prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget

Katowice 2020

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu
PRELUDIUM 2017/25/N/NZ8/01676

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

Pani Prof. dr hab. Zofii Piotrowskiej-Seget,

Promotorowi niniejszej pracy,
za zainteresowanie przedmiotem badań
oraz opiekę merytoryczną, wsparcie, cierpliwość
i wyrozumiałość podczas ich realizacji

Panu dr Franco Magurno,

za owocną i sympatyczną współpracę,
otwarcie ścieżki na nową jakość badań,
pomoc w analizach bioinformatycznych
i motywację do pracy

Pani Prof. Katalin Posta,

za możliwość odbycia stażu
w Faculty of Agricultural and Environmental Sciences,
Szent István University w Gödöllő na Węgrzech

Pani Prof. Paoli Bonfante,

za możliwość odbycia szkolenia
w Department of Life Sciences and Systems Biology,
University of Turin we Włoszech

Dr Marze Novero,

za udostępnienie kultur *in vitro* grzybów mikoryzy arbuskularnej

Dr hab. Damianowi Chmurze,

za pomoc w analizie statystycznej

Szanowanym Koleżankom i Kolegom z Katedry Mikrobiologii,

za ich nieocenioną pomoc, wsparcie, dobre słowo i uśmiech na każdy dzień

Rodzicom, Siostrze, Dziadkom i Teściom, a szczególnie Mężowi Wojtkowi,

za okazaną pomoc, ogromną wiarę w moje umiejętności,
podtrzymanie mnie na duchu i zrozumienie

Magdalenie Świerczyńskiej i Annie Wiluś,

za siłę przyjaźni, ogromne wsparcie i dobre słowo

*Pracę tę dedykuję moim Rodzicom,
jako wyraz wdzięczności za wzbudzenie we mnie duszy naukowca
i otwarcie wszelkich ścieżek duchowych i materialnych
do realizacji moich marzeń,
oraz córeczce Aurelii,
abym zdołała jej przekazać co najmniej tyle samo dobra*

Spis treści

Wykaz skrótów	9
1. Przegląd literatury	12
1.1. Mikoryza i jej rodzaje	12
1.2. Morfologia i cykl życiowy AMF	14
1.3. Strategie rozwojowe i różnorodność funkcjonalna AMF	19
1.4. Znaczenie AM w odżywieniu roślin	23
1.5. Rozwój i funkcjonowanie AM	25
1.5.1. Faza presymbiotyczna	25
1.5.2. Formowanie aparatu prepenetracyjnego.....	26
1.5.3. Formowanie i degeneracja arbuskul	27
1.5.4. Wymiana składników odżywczych pomiędzy symbiontami	28
1.5.4.1. Transport węglowodanów i lipidów z rośliny do grzyba	28
1.5.4.2. Transport fosforu i azotu z grzyba do rośliny	29
1.6. Znaczenie AM w ochronie roślin przed stresem abiotycznym	30
1.7. Potencjał AMF we wspomaganiu fitoremediacji gleb zanieczyszczonych węglowodorami.....	32
1.7.1. Bioróżnorodność AMF w glebach zanieczyszczonych węglowodorami.....	32
1.7.2. Wpływ węglowodorów na rozwój AMF	35
1.7.3. Fitoremediacja gleb skażonych węglowodorami wspomagana AMF	38
1.7.4. Czynniki wpływające na efektywność fitoremediacji wspomaganej AMF	41
2. Cel pracy i hipoteza badawcza.....	44
3. Materiały i metody	46
3.1. Materiały	46
3.1.1. Pobór i przygotowanie prób do badań.....	46
3.2. Metody	48
3.2.1. Charakterystyka fizykochemiczna gleby	48

3.2.2. Ocena kolonizacji mikoryzowej korzeni roślin	48
3.2.2.1. Ocena kolonizacji mikoryzowej korzeni metodą Trouvelota	48
3.2.2.2. Ocena kolonizacji mikoryzowej korzeni metodą qPCR	50
3.2.3. Ocena liczby spor AMF w glebie	51
3.2.4. Pomiar długości mycelium zewnątrzkorzeniowego AMF w glebie	51
3.2.5. Ocena ilości białek glebowych spokrewnionych z glomalinami	52
3.2.6. Analiza profili fosfolipidowych i neutralnych kwasów tłuszczowych w glebie	54
3.2.7. Analiza bioróżnorodności społeczności AMF z zastosowaniem elektroforezy w gradiencie czynnika denaturującego	56
3.2.7.1. Izolacja DNA z gleby i z korzeni	56
3.2.7.2. Warunki reakcji PCR	56
3.2.7.3. Elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego	57
3.2.7.4. Analiza bioróżnorodności społeczności AMF na podstawie profili DGGE	57
3.2.7.5. Identyfikacja dominujących gatunków AMF	58
3.2.8. Analiza bioróżnorodności społeczności AMF z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji	59
3.2.8.1. Projektowanie starterów i referencyjnej bazy danych sekwencji genu LSU rDNA należących do <i>Glomeromycotina</i>	59
3.2.8.2. Przygotowanie, analiza jakościowa oraz sekwencjonowanie bibliotek metagenomicznych	63
3.2.8.3. Analiza bioinformatyczna sekwencji i ich identyfikacja do gatunku z zastosowaniem algorytmu RAxML-EPA	66
3.2.8.4. Analiza bioróżnorodności społeczności AMF w oparciu o MOTUs	66
3.2.8.5. Analiza bioróżnorodności społeczności AMF w oparciu o pokrewieństwo filogenetyczne	67
3.2.9. Utworzenie kolekcji kultur AMF wyizolowanych ze środowiska	68
3.2.9.1. Izolacja AMF z próbek gleby okołokorzeniowej	68
3.2.9.2. Identyfikacja gatunkowa wyizolowanych szczepów AMF	69

3.2.10. Ocena rozwoju AMF w obecności fenolu i PAH oraz ich wpływu na poziom stresu oksydacyjnego u AMF i gospodarza roślinnego	72
3.2.10.1. Założenie kultur doniczkowych AMF z <i>L. perenne</i> , skażonych fenolem i PAH	72
3.2.10.2. Pomiar biomasy i długości pędów roślin	73
3.2.10.3. Ocena kolonizacji mikoryzowej korzeni	73
3.2.10.4. Szacowanie liczby spor AMF w podłożu	73
3.2.10.5. Ocena poziomu stresu oksydacyjnego oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych w korzeniach i liściach	74
3.2.10.6. Ocena poziomu stresu oksydacyjnego oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych w sporach AMF	74
3.2.11. Analizy statystyczne	75
4. Wyniki	77
4.1. Właściwości fizykochemiczne gleby	77
4.2. Kolonizacja mikoryzowa korzeni roślin	78
4.3. Liczba spor, długość strzępki i biomasa AMF oraz zawartość białek spokrewnionych z glomalinami w glebie	81
4.4. Biomasa głównych grup mikroorganizmów w glebie okołokorzeniowej na podstawie zawartości fosfolipidowych kwasów tłuszczowych	82
4.5. Charakterystyka bioróżnorodności społeczności AMF na podstawie profili DGGE genu SSU rDNA	84
4.6. Charakterystyka bioróżnorodności społeczności AMF na podstawie wysokoprzepustowego sekwencjonowania genu LSU rDNA	91
4.6.1. α -bioróżnorodność społeczności AMF	91
4.6.2. β -bioróżnorodność społeczności AMF	96
4.7. Charakterystyka wyizolowanych ze środowiska gatunków AMF	105
4.8. Rozwój AMF i gospodarza roślinnego w kulturach skażonych fenolem i PAH	109
4.8.1. Biomasa i wzrost roślin	109

4.8.2. Kolonizacja mikoryzowa korzeni i wytwarzanie spor	113
4.8.3. Poziom stresu oksydacyjnego w tkankach roślinnych	115
4.8.4. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkankach roślinnych	118
4.8.5. Poziom stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych w sporach AMF	122
5. Dyskusja.....	124
5.1. Wpływ zanieczyszczenia fenolem i PAH na biomasę i bioróżnorodność AMF	124
5.1.2. Rozwój AMF w glebie i w korzeniach.....	124
5.1.3. Bioróżnorodność społeczności AMF	125
5.1.3.1. Wybór odpowiedniego markera genetycznego.....	125
5.1.3.2. Charakterystyka społeczności AMF w oparciu o metody DGGE i NGS ..	129
5.1.4. Biomasa głównych mikroorganizmów w glebie okołokorzeniowej	135
5.2. Kolekcja kultur AMF wyizolowanych z badanych środowisk	136
5.3. Wpływ zanieczyszczenia fenolem i PAH na rozwój wyizolowanych szczepów AMF i ich potencjał we wspomaganiu wzrostu roślin	138
6. Wnioski.....	145
7. Streszczenie	146
8. Summary.....	149
9. Literatura.....	152

Wykaz skrótów

8-OHdG	8-hydroksy-20-deoksyguanozyna
ABC	adenosine-5'-triphosphate-binding cassette, kaseta wiążącą adenozy-5'-trifosforan
AM	arbuscular mycorrhiza, mikoryza arbuskularna
AMF	arbuscular mycorrhizal fungi, arbuskularne grzyby mikoryzowe
AMOVA	analysis of molecular variance, analiza wariancji molekularnej
ANOVA	analysis of variance, analiza wariancji
BDM	test Brunner-Dette-Munka
BLAST	basic local alignment search tool
BSA	bovine serum albumin, albumina surowicy bydlęcej
C	conductivity, przewodność
CAT	catalase, katalaza
CCA	canonical correspondance analysis, kanoniczna analiza korespondencyjna
CCaMK	calcium–calmodulin-dependent protein kinase, kinaza białkowa zależna od wapnia i kalmoduliny
CMN	common mycorrhizal network, wspólna sieć mikoryzowa
CSP	common symbiotic pathway, powszechna ścieżka symbiotyczna
C-S-R ruderalny	competitive-stress tolerator-ruderal, konkurencyjny-tolerujący stress-ruderalny
DBA	dibenzo[a,h]anthracene, dibenzo[a,h]antracen
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis, elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego
DGC	distance-based greedy clustering, metoda grupowania oparta na algorytmie zachłannym
DMM	Dirichlet multinominal mixtures, model wielomianowy Dirichleta
EE-GRSP	easily extractable glomalin-related soil proteins, łatwo-ekstrahowalne białka glebowe spokrewnione z glomalinami
ECM	ectomycorrhiza, ektomikoryza
ERH	extraradical hyphae, strzępka zewnętrzzkorzeniowa
ERM	extraradical mycelium, mycelium wewnętrzzkorzeniowe

FAS-I	fatty acid synthase complex I, kompleks syntazy kwasów tłuszczowych I
FLU	fluoranthene, fluoranten
GS/GOGAT	glutamine synthetase/glutamine oxoglutarate aminotransferase, syntetaza glutaminy/syntaza glutaminianowa, cykl
GTR+G	general time-reversible + gamma distribution, model substytucji nukleotydów zakładający odwracalność ewolucji z uwzględnieniem rozkładu gamma
HOMOVA	analysis of the homogeneity of molecular variance, analiza homogeniczności wariancji molekularnej
HSD	honestly significant difference, rozsądnie istotnej różnicy, test
IPTG	izopropylo- β -D-tiogalaktopiranozyd
IRH	intraradical hyphae, strzępka wewnątrzkorzeniowa
IRM	intraradical mycelium, mycelium wewnątrzkorzeniowe
ITS	internal transcribed spacer
IQR	interquartile range, zakres międzykwartylowy
LB	lysogeny broth, bulion lizogeny
LSU rDNA	large subunit ribosomal DNA, duża podjednostka rybosomalnego DNA
MAG	monoacylglycerol
MDA	malonylodialdehyd
MHB	mycorrhiza-helper bacteria, bakterie wspomagające rozwój mikoryzy arbuskularnej
ML	maximum likelihood, analiza skupień metodą największej wiarygodności
MOTU	molecular operational taxonomic unit, molekularna operacyjna jednostka taksonomiczna
NAH	naphthalene, naftalen
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NGS	next generation sequencing, sekwencjonowanie nowej generacji
NLFAs	neutral fatty acids, neutralne kwasy tłuszczowe
NMDS	non-metric multidimensional scailing, nieparametryczne skalowanie wielowymiarowe
OTU	operational taxonomic unit, operacyjna jednostka taksonomiczna
PAM	periarbuscular membrane, błona periarbuskularna

PAS	periarbuscular space, przestrzeń periarbuskularna
PBS	phosphate buffered saline, buforowana fosforanem sól fizjologiczna
PGPR	plant growth promoting rhizobacteria, ryzobakterie promujące wzrost roślin
PHE	phenanthrene, fenantren
PLFAs	phospholipid fatty acids, fosfolipidowe kwasy tłuszczowe
POX	peroxidase, peroksydaza
PPA	prepenetration apparatus, aparat prepenetracyjny
PYR	pyrene, piren
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy
RAxML-EPA	randomized accelerated maximum likelihood-evolutionary placement algorithm
RNJ	relaxed neighbour joining, zrelaksowany algorytm najbliższego sąsiada
SD	standard deviation, odchylenie standardowe
SM	soil moisture, wilgotność gleby
SOD	superoxide dismutase, dysmutaza nadtlenkowa
SOM	soil organic matter, glebowa materia organiczna
SSU rDNA	small subunit ribosomal DNA, mała podjednostka rybosomalnego DNA
TAG	triacylglycerol
T-GRSP	total glomalin-related soil proteins, całkowita zawartość białek glebowych spokrewnionych z glomalinami
TotN	total nitrogen, azot całkowity
TPH	total petroleum hydrocarbons, całkowita zawartość węglowodorów ropopochodnych
UPGMA	unweighted pair-group method using arithmetic averages, analiza skupień metodą średnich połączeń
PAH	polynuclear aromatic hydrocarbons, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolylo-beta-D-galaktopiranozyd

1. Przegląd literatury

1.1. Mikoryza i jej rodzaje

Mikoryza (z gr. *mycos* – grzyb, *rhiza* – korzeń) to mutualistyczny związek grzyba z korzeniami rośliny, opierający się na wzajemnej wymianie składników odżywczych pomiędzy symbiontami. Grzyb może rozwijać się w apoplaście korzenia tworząc ektomikoryzę (ECM – ang. ectomycorrhiza), bądź kolonizować wnętrza komórek korykalnych korzenia tworząc endomikoryzę. W zależności od gatunku rośliny i grzyba, wyróżnia się endomikoryzę arbuskularną, orchidalną i erikoidalną (Fitter, 2005). Najpowszechniejsza jest mikoryza arbuskularna (AM – ang. arbuscular mycorrhiza). Występuje u ok. 79% gatunków lądowych roślin naczyniowych. Ektomikoryza występuje u 2%, mikoryza orchidalna u 10%, natomiast mikoryza erikoidalna u 1,5% gatunków roślin lądowych. Jedynie 8% gatunków roślin nie wchodzi w żadną symbiozę mikoryzową (Brundrett i Tedersoo, 2018).

Ektomikoryza jest formowana pomiędzy grzybami reprezentującymi klasy *Agaricomycetes* (*Basidiomycota*), *Pezizomycetes* (*Ascomycota*) oraz rodzaj *Endogone* (*Mucorinomycota*), a krzewami i drzewami, dominując w lasach strefy umiarkowanej, borealnej i śródziemnomorskiej. Grzyby ektomikoryzowe okalają kolonizowane korzenie arkuszem mycelium zwanym opilśnią lub mufką, a ich strzępka rozrasta się w apoplaście jako tzw. sieć Hartiga (Ryc. 1). W typowej ECM, roślina zapewnia grzybowi źródło węgla, otrzymując w zamian wodę, składniki mineralne i proste związki organiczne dostarczane przez strzępkę (Tedersoo i wsp., 2006; Smith i Read, 2008).

AM to jedna z najstarszych, najbardziej wyspecjalizowanych i konserwatywnych symbioz na ziemi, która występując powszechnie, miała ogromne znaczenie w kształtowaniu ekosystemów lądowych. Pojawiła się około 460 mln lat temu w ordowiku, wraz z pierwszymi roślinami lądowymi, posiadającymi ryzoidy (Hoysted i wsp., 2019). AM występuje niemal we wszystkich biomach, od regionów subpolarnych, aż po tropiki, pustynie, bagna i obszary wysokogórskie (Smith i Read, 2008). AM występuje u roślin naczyniowych, wątrobowców i glików (Bonfante i Genre, 2008; Wang i wsp., 2010). Rośliny, u których nie stwierdzono AM, to w większości gatunki o specjalnych wymaganiach odżywczych, np. rośliny mięsożerne i pasożytnicze, lub środowiskowych, np. hydrofity czy epifity (Brundrett i Tedersoo, 2018). Do popularnych roślin zielnych nie wchodzących w symbiozę z arbuskularnymi grzybami mikoryzowymi (AMF – ang.

arbuscular mycorrhizal fungi) zaliczamy rodzinę *Brassicaceae* i niektóre *Caryophyllales*. AM nie jest też formowana u niektórych nagozalążkowych drzew i krzewów. Brak symbiozy z AMF u tych roślin wynika z utraty części genów powszechnej ścieżki symbiotycznej (CSP – ang. common symbiotic pathway), produkcji naturalnych fungicydów, wytworzenia barier mechanicznych w postaci grubych ścian komórkowych, czy ekstremalnie cienkich korzeni (Bravo i wsp., 2016; Kamel i wsp., 2017). Geograficzne ogniska niemikoryzowe obejmują bardzo jałowe i zdegradowane, śródlądowe tereny zachodniej Australii i południowej Afryki, a także rejony arktyczne i alpejskie (Lambers i wsp., 2011).

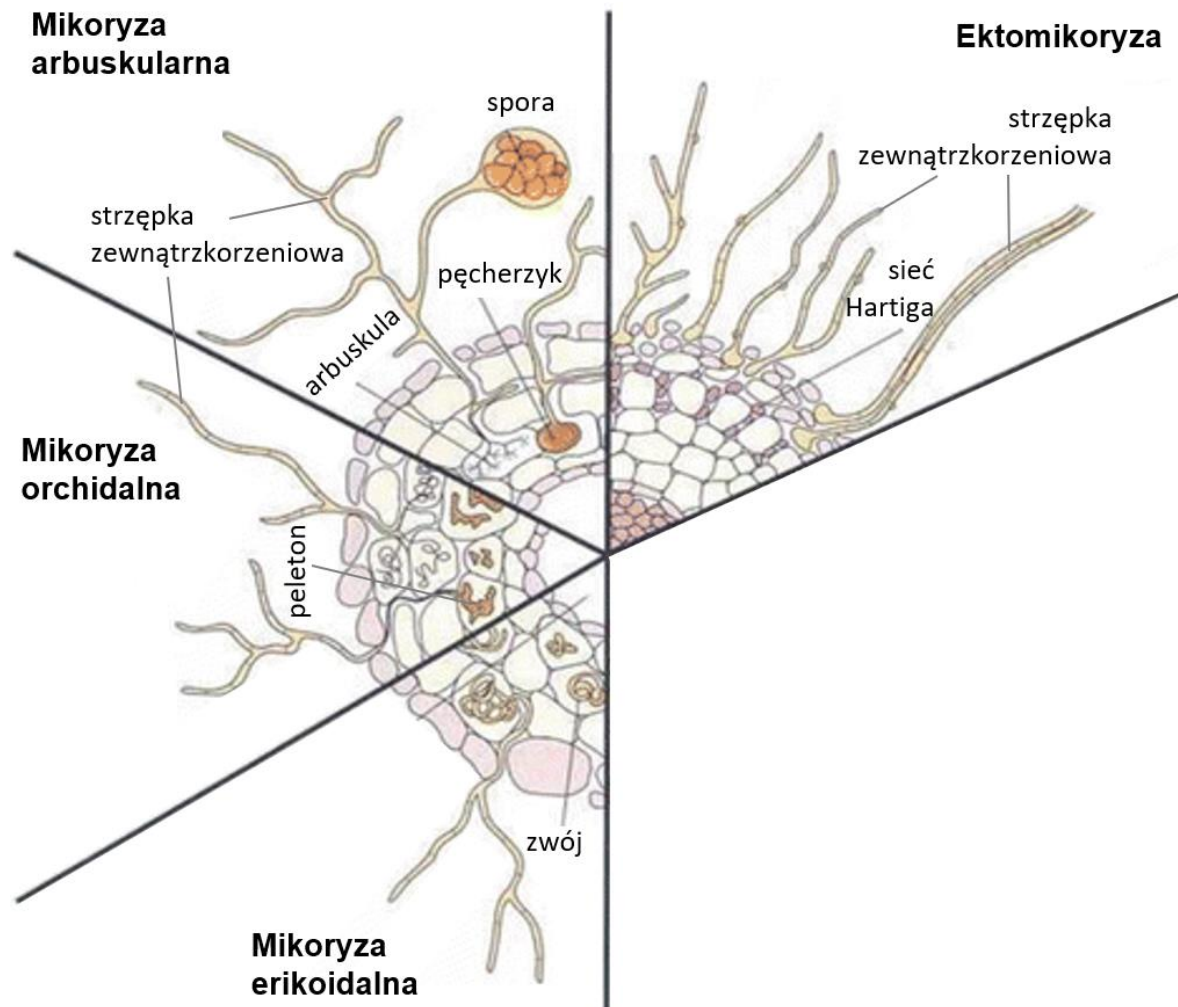
Obowiązująca do niedawna pozycja filogenetyczna AMF klasyfikowała je jako monofiletyczną gromadę *Glomeromycota* (Schüßler i wsp., 2001). Wnikliwa analiza sekwencji genów rybosomalnych, poszerzona o analizę filogenomiczną, wpłynęła na zmianę pozycji systematycznej AMF na podgromadę *Glomeromycotina*. Wraz z podgromadami *Mucoromycotina* i *Mortierellomycotina* tworzy ona gromadę *Mucoromycota*, obejmującą grzyby endofityczne, mikoryzowe oraz pasożytnicze. W obrębie podgromady *Glomeromycotina* wyróżniamy cztery rzędy: *Glomerales*, *Diversisporales*, *Archaeosporales* i *Paraglomerales* (Spatafora i wsp., 2017).

AMF to obligatoryjne biotrofy, które penetrują wnętrza komórek korykalnych korzenia, pobierając cukier i lipidy syntetyzowane wyłącznie przez gospodarza roślinnego (Ryc. 1). W zamian, partner grzybowy dostarcza roślinie fosfor, azot i wodę, dodatkowo chroniąc gospodarza przed szkodliwymi czynnikami biotycznymi i abiotycznymi (Bago i Bécard, 2002; Millar i Bennett, 2016).

Kolejny typ endomikoryzy, mikoryza erikoidalna (Ryc. 1), jest zawiązywana pomiędzy roślinami z rodzin *Ericaceae* i *Diapensiaceae*, a partnerem grzybowym reprezentującym rzędy *Helotiales*, *Chaetothyriales* (*Ascomycota*) i taksony w obrębie klasy *Agaricomycetes* (*Basidiomycota*). Występuje powszechnie na wrzosowiskach półkuli północnej, w środowiskach o kwaśnej i jałowej glebie i na dużych wysokościach (Smith i Read, 2008; Brundrett i Tedersoo, 2018).

Mikoryza orchidalna (Ryc. 1) jest związkiem roślin z rodziny *Orchidaceae* z grzybami ektomikoryzowymi lub saprofitycznymi należącymi do klas *Agaricomycetes* i *Pezizomycetes*, a w szczególności z rodzin *Tulasnellaceae*, *Ceratobasidiaceae* i *Serendipitaceae* (*Sebacinales*). Występuje głównie u gatunków orchidei tropikalnych. Symbioza ta ma dla rośliny charakter obligatoryjny, ponieważ jest niezbędna do indukcji

rozwoju siewek z protokormów. Zarówno w mikoryzie orchidalnej jak i erikoidalnej, partner grzybowy dostarcza roślinie składniki mineralne i proste związki organiczne. Natomiast, nie zaobserwowano dotychczas transportu węgla z rośliny do grzyba (Smith i Read, 2008; Brundrett i Tedersoo, 2018).

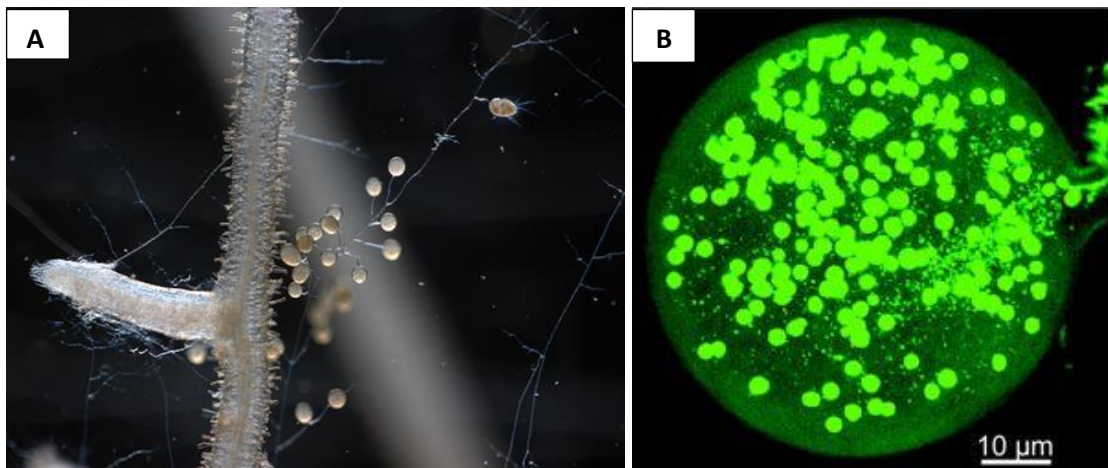


Ryc. 1. Struktury wytwarzane w korzeniach w poszczególnych rodzajach mikoryzy (Amballa i Bhumi, 2017; zmieniono).

1.2. Morfologia i cykl życiowy AMF

AMF cechuje bardzo prosta morfologia i cykl życiowy. Do niedawna uważano, że rozmnażają się wyłącznie wegetatywnie, ponieważ nigdy nie zaobserwowano u nich rozmnażania płciowego na poziomie morfologiczno-komórkowym. W genomie AMF wykazano jednak obecność genów odpowiadających za proces mejozy i rozmnażanie

płciowe oraz *locus* MAT, warunkującego typ płciowy. Mogą one świadczyć o funkcjonowaniu kryptycznego cyklu płciowego u AMF (Riley i wsp., 2014). Typowa strzępka AMF jest nieseptowana, koenocytarna i wytwarza wegetatywne spory, jedne z największych w świecie grzybów, w których występują setki haploidalnych jąder komórkowych (Ryc. 2. A, B) (Pawlowska i Taylor, 2004). Spory, wykorzystując zmagazynowane w nich substancje zapasowe, kiełkują w glebie wytwarzając nową strzępkę rosnącą w kierunku korzenia rośliny (Ryc. 3).

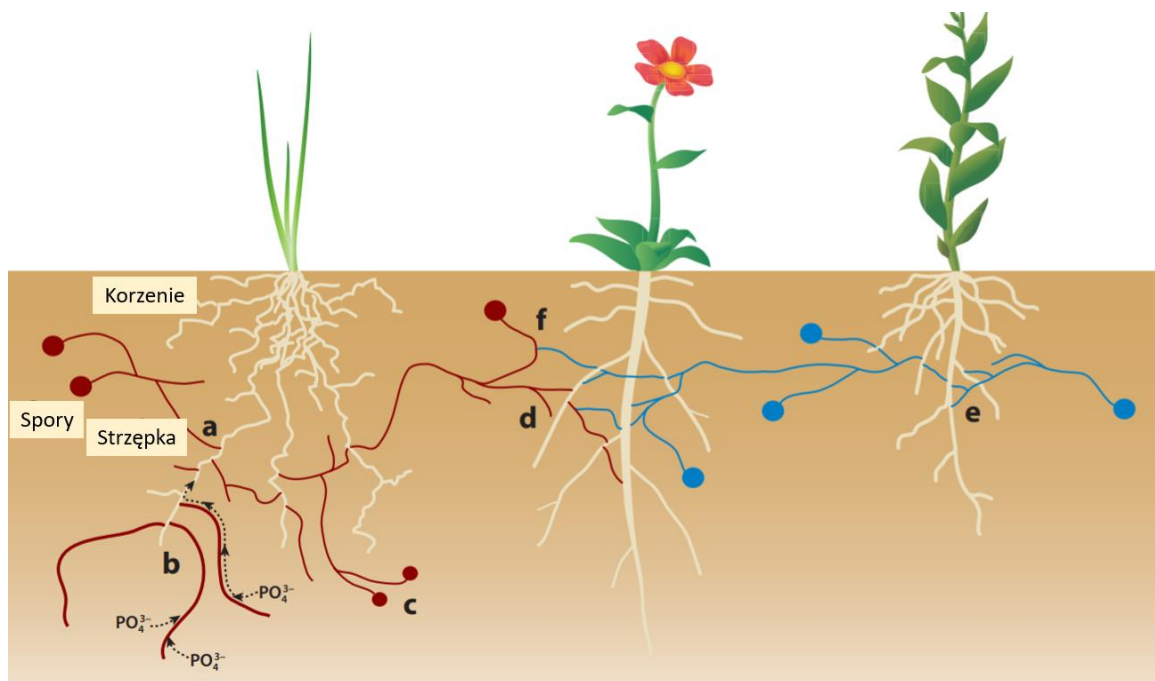


Ryc. 2. A. Korzeń marchwi skolonizowany przez *Rhizophagus irregularis*. Widoczna ERH z klastrem spor (autor: Guillaume Bécard, <https://jgi.doe.gov>). **B.** Fotografia mikroskopowa spory *Glomus diaphanum* z widocznymi jądrami komórkowymi, barwienie SYTO Green (Marleau i wsp., 2011).

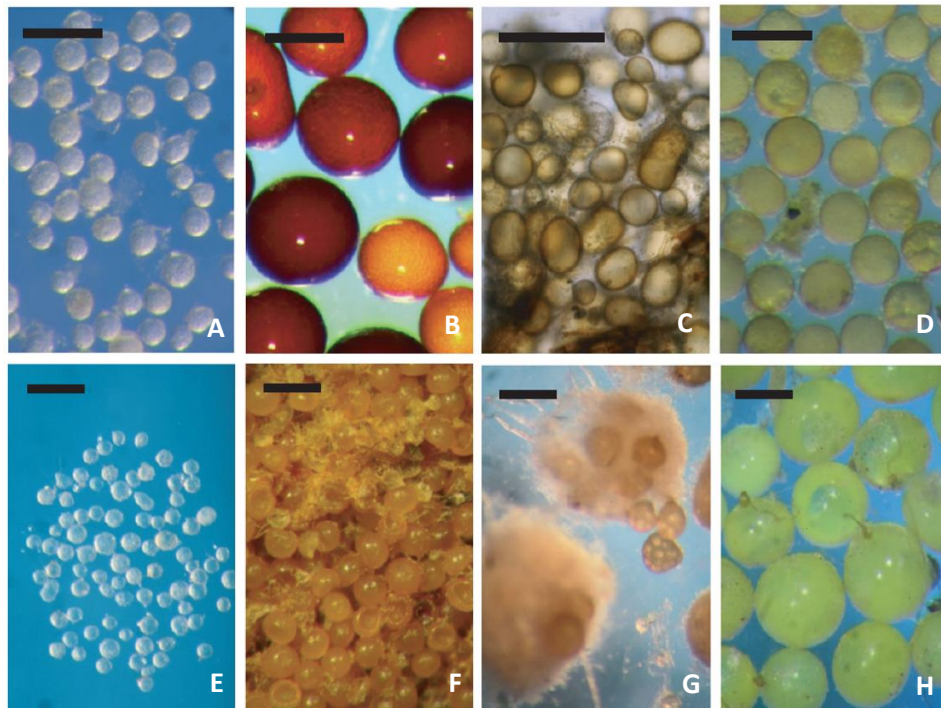
Spory AMF różnią się przede wszystkim wielkością i kolorem (Ryc. 4). Największe, różnobarwne spory, o wielkości kilkuset mikrometrów, wytwarzają AMF z rodziny *Gigasporaceae* (rzęd *Diversisporales*) (Ryc. 4. H). Natomiast, najmniejsze, szkliste spory, o wielkości kilkudziesięciu mikrometrów, należą do pierwotnych AMF z rzędów *Archaeosporales* i *Paraglomerales* (Ryc. 4. A, E) (Smith i Read, 2008). AMF z rzędu *Glomerales* wytwarzają spory żółto-brązowe w szerokim przedziale wielkości (100 – 200 μm) (Ryc. 4. C, D, G).

Spory AMF dzieli się na trzy główne typy morfologiczne: glomoidalny, akaulosporoidalny i gigasporoidalny (Morton i Benny, 1990). Spory, typu glomoidalnego, wytwarzane są przez AMF z rodzin: *Claroideoglomeraceae* i *Glomeraceae* (rzęd *Glomerales*), *Diversisporaceae* (rzęd *Diversisporales*), *Paraglomeraceae* (rzęd *Paraglomerales*) i *Ambisporaceae* (rzęd *Archaeosporales*). Spory te powstają na końcu strzępki zarodnikotwórczej, która zachowuje ciągłość ze strzępką zewnątrzkorzeniową

(ERH – ang. extraradical hyphae). Kielkują poprzez wzrost strzępki kielkowej przechodzącej przez światło trzonka spory. Spory typu gigasporoidalnego, wytwarzane przez rodzinę *Gigasporaceae*, powstają z komórki sporogennej, wyrosłej na szczycie strzępki zarodnikotwórczej. W zależności od gatunku AMF, liczne strzępki kielkowe wyrastają z brodawkowatych wypustek w wewnętrznej ścianie zarodnika, bądź ze specjalnej tarczki przedkielkowej. Spory typu akaulosporoidalnego wytwarzają AMF z rodzin *Acaulosporaceae* (rzęd *Diversisporales*) oraz *Ambisporaceae* (rzęd *Archaeosporales*). Powstają one na ramieniu specjalnego pęcherza zarodnikotwórczego. Strzępka kielkowa wyrasta ze specjalnej struktury przedkielkowej (Oehl i wsp., 2011; Souza, 2015).



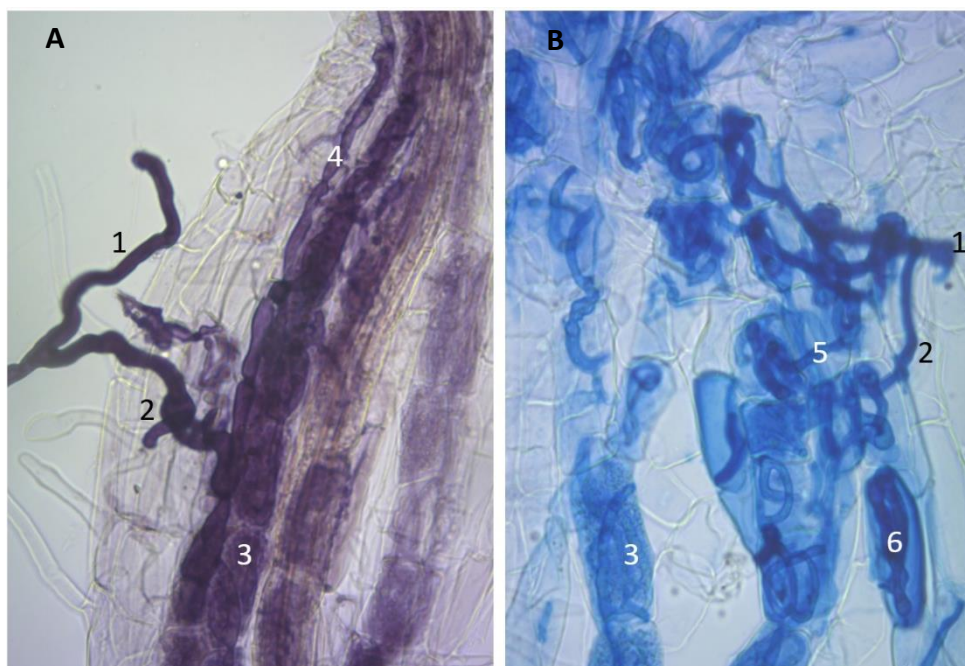
Ryc. 3. Cykl życiowy AMF. Strzępka, wyrosła ze spor kielkujących w glebie, kolonizuje korzenie rośliny lub łączy się z istniejącą siecią mikoryzową (a); strzępka rozrasta się wewnątrz i na zewnątrz korzeni, zapewniając transfer składników odżywczych z gleby do rośliny i pobierając zasymilowany przez roślinę węgiel (b); ERH wytwarza kolejne pokolenie spor (c); kolonizuje korzenie kolejnej rośliny (d); nawet jeżeli jest ona wsymbiozie z innym grzybem (e); bądź łączy się z ERH innego grzyba w procesie anastomozy (f) (Sanders i Croll, 2010).



Ryc. 4. Spory wytwarzane przez *Glomeromycotina*, przynależne rodzajów: *Archaeospora* (A), *Acaulospora* (B), *Rhizophagus* (C), *Claroideoglomus* (D), *Paraglomus* (E), *Diversispora* (F), *Funneliformis* (G), *Gigaspora* (H). Podziałka = 200 μ m (Young, 2012).

Strzępka wyrosła ze spory kolonizuje roślinę (Ryc. 3), rozrastając się pomiędzy komórkami korytkalnymi korzenia, po czym penetruje wnętrza komórek i tworząc boczne odgałęzienia wytwarza arbuskule (z łac. *arbusculum* – krzew, małe drzewo). Arbuskule to struktury symbiotyczne, w których zachodzi właściwa wymiana składników odżywczych pomiędzy grzybem i rośliną. Niektóre gatunki AMF wytwarzają wewnątrz korzeni pęcherzyki funkcjonujące jako struktury magazynowe (Smith i Read, 2008). W zależności od gatunku gospodarza roślinnego i gatunku AMF, występują dwa podstawowe typy morfologiczne mikoryzy: *Arum* i *Paris* (Ryc. 5). W bardziej powszechnym typie *Arum* strzępka wewnątrzkorzeniowa (IRH – ang. intraradical hyphae) rozrasta się międzykomórkowo wzdłuż osi korzenia tworząc charakterystyczny wzór w kształcie litery H. Z jej bocznych rozgałęzień wyrastają silnie dychotomicznie rozgałęzione arbuskule zajmujące całe wnętrza komórek. W typie *Paris* pojedyncza strzępka rośnie bezpośrednio z komórki do komórki wytwarzając w ich wnętrzu węzły i zapętlenia, na powierzchni których, rozwijają się małe, liczne arbuskule (Bonfante i Genre, 2008). Mikoryza typu *Arum* jest wytwarzana przez AMF z rzędu *Glomerales*, które kolonizują korzenie bardzo intensywnie, wytwarzając barwiące się wyraźnie i kontrastowo arbuskule. W korzeniach występują również liczne pęcherzyki i spory. U rodziny *Diversisporaceae* IRH tworzy

zwoje w pobliżu hyfopodium i wytwarza arbuskule o bardzo cienkich rozgałęzieniach. Niektóre gatunki wytwarzają pęcherzyki. AMF z rodziny *Gigasporaceae* kolonizują korzenie lokalnie, wytwarzając silnie rozgałęzione i intensywnie barwiące się arbuskule powstałe z rozdętego trzonu. IRH o bardzo szerokim przekroju tworzy grube wybrzuszenia i zwoje, szczególnie w pobliżu hyfopodium i wewnątrz komórek korykalnych. Strukturami charakterystycznymi dla rodziny *Gigasporaceae* są agregaty komórek pomocniczych wytwarzane w pobliżu korzeni przez ERH. Podobne zwoje w lokalnych ogniskach kolonizacyjnych wytwarza IRH AMF z rodziny *Acaulosporaceae*. Kolonizacja korzeni przez AMF z rodzin *Archaeosporaceae* i *Paraglomeraceae* ma charakter sporadyczny. IRH wytwarza cienkie zwoje i delikatne arbuskule, które słabo się wybarwiają i łatwo przeoczyć je pod mikroskopem (Oehl i wsp., 2011; Souza, 2015).



Ryc. 5. Podstawowe typy kolonizacji korzeni przez AMF, *Arum* (A) i *Paris* (B): ERH (1), hyfopodium (2), arbuskula (3), IRH w apoplacie (4), IRH penetrująca komórki korykalne (5), zwoje IRH w komórkach korykalnych (6); opracowanie własne.

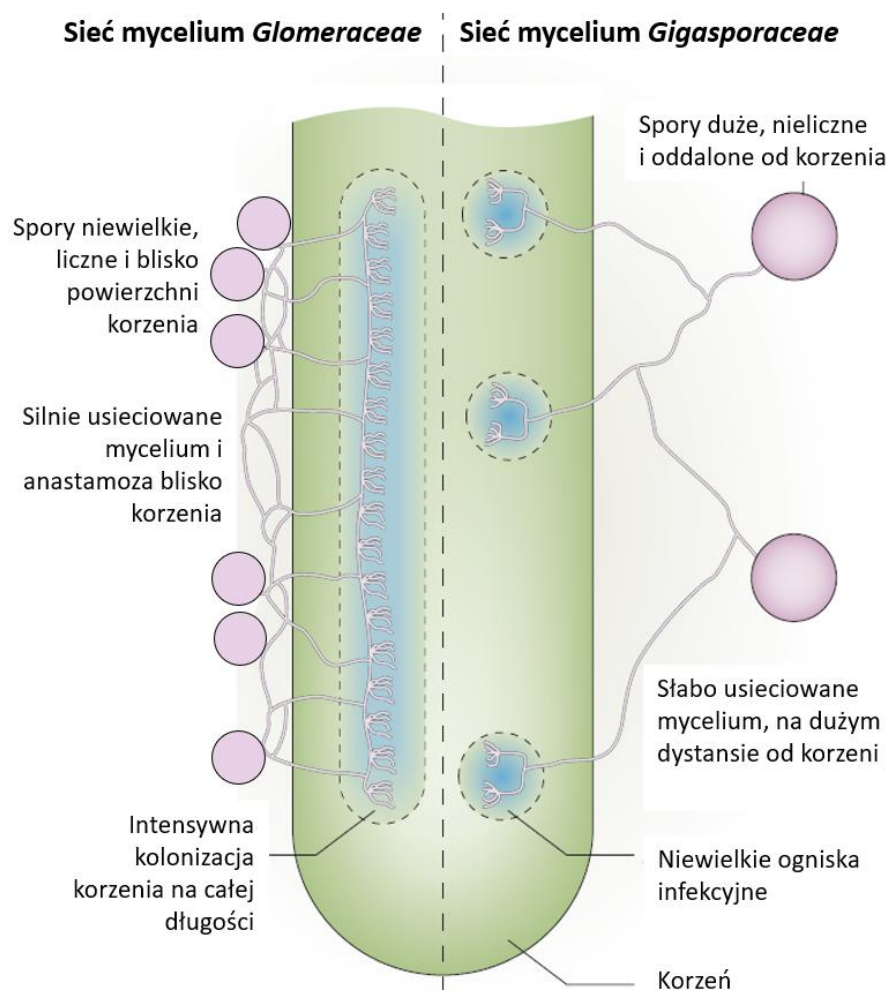
IRH może wyrastać z korzenia jako ERH, która penetruje korzeń kolejnej rośliny lub łączy się z inną konspecyficzną ERH w procesie anastomozy, w którym dochodzi do wzajemnej wymiany jąder komórkowych. ERH w ciągu 30-60 dni wytwarza kolejne pokolenie spor, w których występuje mieszanka jąder pochodzących od różnych osobników (Ryc. 3) (la Providencia i wsp., 2005).

1.3. Strategie rozwojowe i różnorodność funkcjonalna AMF

Oddalone filogenetycznie rzędy *Glomeromycotina* cechuje nie tylko odmienna morfologia, lecz także różne strategie życiowe. Predysponują one określone taksony do optymalnego rozwoju w środowisku definiowanym przez społeczność roślinną, o określonej bioróżnorodności, dynamice i produktywności (Chagnon i wsp., 2013; Millar i Bennet, 2016; Aguilar-Trigueros i wsp., 2019).

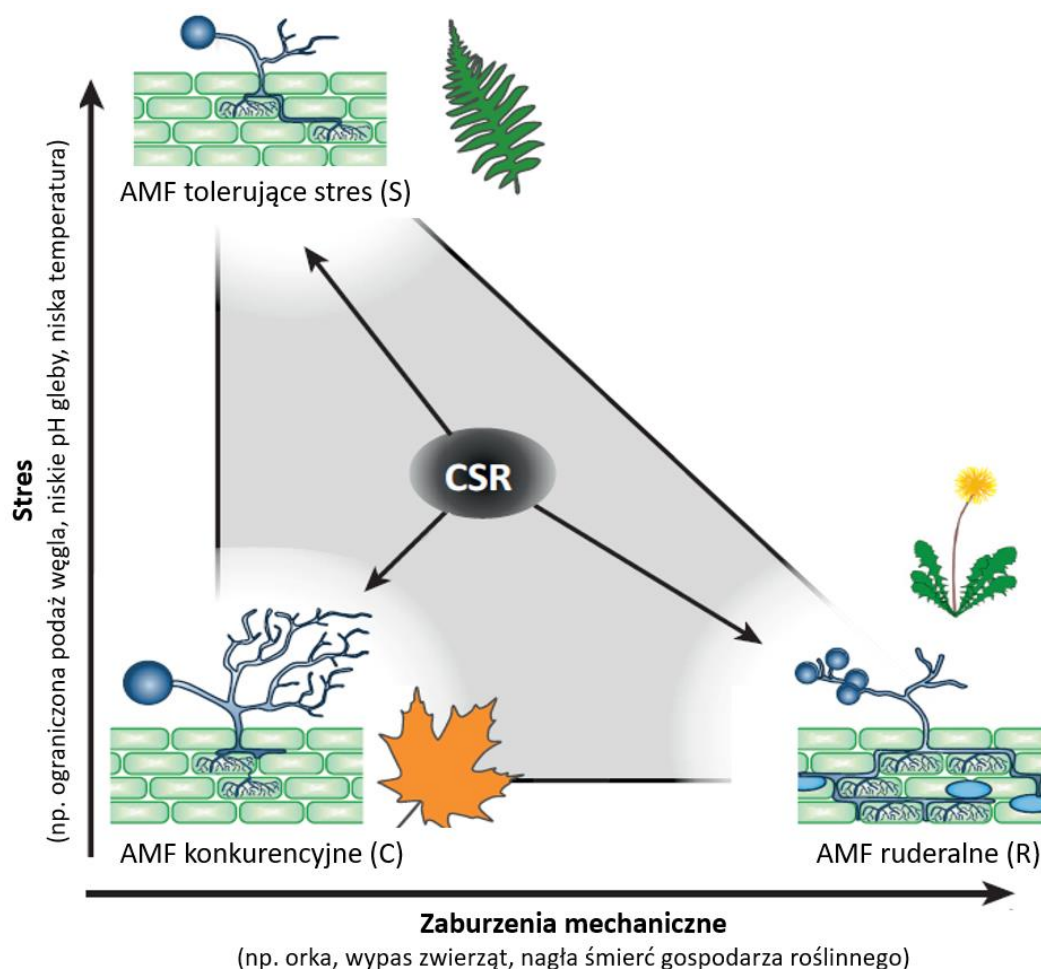
Najprościej, *Glomeromycotina* można podzielić na dwie grupy ekologiczne, „generalistów” i „specjalistów” (Oehl i wsp., 2003). Do tych pierwszych zalicza się rząd *Glomerales* obejmujący najbardziej pospolite AMF. Mają one niskie wymagania ekologiczne i tendencję do dominowania w środowiskach zaburzonych, rolniczych i poddanych antropopresji. Ich krótki cykl życiowy polega na szybkiej, intensywnej kolonizacji korzeni roślin i inwestycji uzyskanego od rośliny węgla w produkcję bardzo dużej ilości spor o krótkim okresie żywotności. *Glomerales* tworzą sieci mikoryzowe blisko powierzchni gleby i korzeni, produkując liczne spory wewnątrzkorzeniowe (Ryc. 6). Zdolność do produkcji ogromnej ilości spor o różnych rozmiarach, nawet przez tego samego osobnika, a także niska specyficzność względem gospodarza roślinnego, świadczą o wysokim potencjale przystosowawczym *Glomerales* do zmiennych warunków środowiskowych (Voets i wsp., 2006; Maherali i Klironomos, 2007; Parniske, 2008; Aguilar-Trigueros i wsp., 2019).

Odmianą strategię rozwojową, charakterystyczną dla „specjalistów” reprezentują AMF z rodziny *Gigasporaceae*, należące do najmłodszego ewolucyjnie rzędu, *Diversisporales*. *Gigasporaceae* są przystosowane do życia w glebach o zdefiniowanych warunkach fizykochemicznych, np. o kwaśnym lub alkalicznym odczynie lub też zasiedlonych przez określony typ roślinności. *Gigasporaceae* większość biomasy i zasobów alokują do ERH, wytwarzając sieć mikoryzową o niskim zagęszczeniu, lecz rozciągającą się na dalekie dystanse od korzeni. Stosując „strategię jakościową”, *Gigasporaceae* produkują nieliczne, lecz bardzo duże i trwałe spory oraz mycelium o silnych właściwościach regeneracyjnych, co gwarantuje im lepszą przeżywalność (Ryc. 6) (Voets i wsp., 2006; Maherali i Klironomos, 2007; Parniske, 2008; Aguilar-Trigueros i wsp., 2019).



Ryc. 6. Schemat strategii rozwojowych AMF reprezentowanych przez „generalistów” (*Glomeraceae*) i „specjalistów” (*Gigasporaceae*) (Parniske, 2008; zmieniono).

Strategie życiowe AMF wpisują się w model C-S-R (ang. competitive-stress tolerator-ruderal) Grima, grupujący AMF względem ich cech funkcjonalnych na konkurencyjne, tolerujące stres i ruderalne (Ryc. 7). Zazwyczaj model ten stosuje się do definiowania strategii życiowych roślin i przewidywania kierunku sukcesji zespołów roślinnych w warunkach stresu i zaburzeń środowiskowych (Grime i Pierce, 2012). W przypadku określania strategii życiowych AMF, pod uwagę bierze się zapotrzebowanie na węgiel od gospodarza roślinnego, transfer fosforu do korzeni, magazynowanie zasobów węgla oraz stosunek biomasy mycelium wewnątrzkorzeniowego (IRM – ang. intraradical mycelium) do biomasy mycelium wewnątrzkorzeniowego (ERM – ang. extraradical mycelium). Pomiędzy ściśle określonymi strategiami C-S-R występują formy pośrednie, w które wpisuje się większość taksonów AMF (Chagnon i wsp., 2013).



Ryc. 7. Schemat modelu C-S-R Grimma ilustrujący strategie rozwojowe AMF i typ kolonizowanej roślinności (Chagnon i wsp., 2013; zmieniono).

Rozwojowi AMF o konkurencyjnej strategii życiowej sprzyjają środowiska zrównoważone i niezaburzone, które cechuje niska zawartość fosforu oraz wysoki stosunek zawartości azotu do fosforu w glebie (Ryc. 7). Takie warunki nie zmuszają AMF do produkcji dużej ilości potomnych spor. Promowany jest rozwój mikoryzy w kierunku zwiększania wydajności pozyskiwania składników odżywczych od roślin. Środowisko zostaje więc zdominowane przez AMF, które wygrywają walkę o zasoby węgla dostarczane przez gospodarza (Hodgson i wsp., 1999; Chagnon i wsp., 2013). Konkurencyjne AMF charakteryzują się ekstensywnym rozwojem sieci mikoryzowej, która umożliwia dostarczenie partnerowi roślinnemu odpowiedniej ilości fosforu. W związku z intensywnym zużyciem węgla na funkcjonowanie symbiozy, konkurencyjne AMF nie produkują dużych ilości struktur magazynowych takich, jak pęcherzyki i spory (Avio i wsp., 2006; Kiers i wsp., 2011; Chagnon i wsp., 2013). Doskonałym przykładem tej grupy funkcjonalnej jest

rodzina *Gigasporaceae*, cechująca się niskim stosunkiem biomasy IRM do ERM (Hart and Reader, 2002). Przedstawiciele *Gigasporaceae* wytwarzają niewielkie ilości bardzo dużych spor i bardzo późno na przestrzeni sezonu wegetacyjnego (Oehl i wsp., 2009; Aguilar-Trigueros i wsp., 2019). Kompatybilnym gospodarzem roślinnym konkurencyjnych AMF są rośliny o dużej biomasy i wysokiej wydajności fotosyntetycznej, które wymagają wysokiej podaży fosforu, np. częściowo zdrewniałe rośliny wieloletnie (Chagnon i wsp., 2013; López-García i wsp., 2014).

AMF ruderalne dominują w środowiskach narażonych na zaburzenia mechanicznie gleby (Ryc. 7). Potrafią one tworzyć nowe mikoryzy z niewielkich fragmentów skolonizowanych korzeni, a zatem mogą się rozwijać pomimo częstego zaburzania ciągłości sieci ERM. Cechuje je krótki cykl życiowy, w którym priorytetem jest szybka i intensywna kolonizacja korzeni, wzrost ERM, anastomoza oraz produkcja bardzo licznych spor, kosztem wytwarzania biomasy o krótkiej żywotności (Avio i wsp., 2006; Chagnon i wsp., 2013; Varela-Cervero i wsp. 2016; Aguilar-Trigueros i wsp., 2019). Typowymi przedstawicielami ruderalnych AMF są rodziny *Glomeraceae* i *Claroideoglomeraceae*, które charakteryzuje wytwarzanie większej biomasy IRM w stosunku do biomasy ERM. *Glomeraceae* dominują w społecznościach AMF środowisk rolnych, poddawanych intensywnej orce, narażonych na antropopresję i pastwiskach (Hart i Reader, 2002; Jansa i wsp., 2002; Varela-Cervero i wsp., 2016). Kompatybilnymi gospodarzami ruderalnych AMF są rośliny ruderalne, pionierskie i jednoroczne. Szybkorosnące, lecz o krótkim okresie wegetacyjnym, których wzrost nie jest limitowany podażą fosforu (López-García i wsp. 2014; Grilli i wsp., 2015).

AMF tolerujące stres inwestują w strategię oszczędzania zasobów węgla uzyskanych od gospodarza roślinnego, którego podaż w warunkach stresu może być niska (Ryc. 7). AMF rosną wolno, wytwarzając niewiele biomasy o długiej żywotności. Ponadto, niewielka biomasa ERM zmniejsza ekspozycję AMF na stres abiotyczny (Chagnon i wsp., 2013). Powyższe cechy posiadają rodziny *Acaulosporaceae* i *Diversisporaceae*, czyli AMF produkujące niewiele biomasy zarówno wewnątrz, jak i zewnątrzkorzeniowej (Hart i Reader, 2002; Varela-Cervero i wsp. 2016). Pomimo szybkiego wzrostu i intensywnej kolonizacji roślin, do tej grupy, w związku z niewielkim zapotrzebowaniem na węgiel, wpisuje się również rodzina *Glomeraceae* (Lerat i wsp., 2003; Chagnon i wsp., 2013). AMF tolerujące stres mogą wchodzić w interakcje z roślinami wieloletnimi, o niewielkiej biomasy, mało wydajnej fotosyntezie i tolerującymi środowiska zacienione (Heinemeyer i wsp., 2004).

Podsumowując, dobór symbionta roślinnego i grzybowego w mikoryzie arbuskularnej nie jest specyficzny gatunkowo. Oparty jest na zasadzie dopasowania strategii rozwojowych grzyba i rośliny, którą cechuje pewna plastyczność. Cechy fenotypowe danego szczepu AMF mogą ulec modyfikacji w zależności od odmiennej strategii życiowej gospodarza roślinnego. Dla przykładu, ten sam grzyb, kolonizując krwawnika pospolitego może produkować duże spory, natomiast w kulturach z życią wielokwiatową wytwarzać rozległą sieć ERM (Koch i wsp., 2017). Ogromna plastyczność konspecyficzných szczepów AMF powoduje, że różnorodność funkcjonalna AM wpisuje się w pełni w kontinuum symbioza-pasożytnictwo, gdyż w danych warunkach, różne szczepy tego samego gatunku mogą zarówno promować, jak i zaburzać wzrost roślin. Zatem, dopasowanie grzyba i rośliny ma ogromne znaczenie pod względem funkcjonalnym, biorąc pod uwagę ich wymagania odżywcze, globalny i lokalny zasięg ekologiczny, czy oddziałujące w danym czasie czynniki środowiskowe (Schmidt i wsp., 2011; Mathieu i wsp., 2018; Wipf i wsp., 2019).

1.4. Znaczenie AM w odżywieniu roślin

AM należy do najważniejszych naturalnych czynników warunkujących właściwe odżywienie roślin, stanowiąc ogniwo napędzające obieg węgla i fosforu oraz produkcję pierwotną w ekosystemach (Fitter i wsp., 2005). Ograniczony dostęp do składników odżywczych stanowi główny czynnik limitujący wzrost roślin. Większość roślin wchodzi więc w symbiozę z AMF (Parniske, 2008). AMF zapewniają roślinie dostęp do składników odżywczych tworząc rozległą sieć mycelium zwaną mykosferą, która stanowi przedłużenie ryzosfery. Szacuje się, że w jednym gramie gleby może znajdować się od 2,7 do 20,5 m ERM (Giovannetti i Avio, 2002; Mikkelsen i wsp., 2008). Cienkie i silnie rozgałęzione ERM sięga daleko poza ryzosferę, umożliwiając roślinie pobór składników odżywczych i wody spoza strefy ich niedoboru, która powstaje wokół korzeni. Ma to szczególne znaczenie w przypadku fosforu, który występuje w glebie głównie w postaci nierozpuszczalnych kompleksów nieorganicznych o niskiej biodostępności. Rośliny, na drodze dyfuzji, pobierają jedynie ortofosforany. Fosfor nierozpuszczalny ulega mobilizacji tylko dzięki bakteriom solubilizującym fosfor oraz AMF (Finlay, 2008; Kalayu, 2019; Wipf i wsp., 2019).

W naturze, pojedyncza roślina może być skolonizowana nawet przez kilkadziesiąt gatunków AMF jednocześnie. Natomiast, pojedynczy grzyb może wchodzić w interakcje

z kilkoma gatunkami roślin (Walder i wsp., 2012). Zatem, utworzenie stabilnej symbiozy podlega ścisłej obustronnej kontroli, wykorzystującej nie strategię niewolnictwa, lecz strategię systemu nagrody. Rośliny zapewniają największą podaż węglowodanów do tych AMF, które najwydajniej transportują składniki odżywcze do korzeni (Kiers i wsp., 2011; Fellbaum i wsp., 2012). W przypadku niskiej podaży węglowodanów, np. na skutek zacienienia, AMF wstrzymują transport fosforu do arbuskul i kumulują polifosforany w ERM, a także obniżają ekspresję genów kodujących transportery fosforu w błonie arbuskularnej (Hammer i wsp., 2011; Fellbaum i wsp., 2014). Jednakże, pomimo nakładania odżywczych „sankcji” na gospodarza, dążąc do zamknięcia cyklu życiowego, AMF utrzymują podaż nutrientów na takim poziomie, aby nie doszło do degeneracji arbuskul (Fellbaum i wsp., 2014). Poważne osłabienie symbiozy następuje głównie ze strony rośliny, dla której symbioza z AMF nie jest obligatoryjna. Zatem, w warunkach przenawożenia fosforem i azotem, utrzymanie symbionta mikoryzowego staje się dla rośliny nieopłacalne. W przypadku obecności dużych ilości fosforu i azotu w podłożu dochodzi do obniżenia produkcji strigolaktonów przez roślinę oraz obniżenia ekspresji genów regulujących dojrzewanie arbuskul, skutkując ich przedwczesną degeneracją (Blanke i wsp., 2005; Breuillin i wsp., 2010; Balzergue i wsp., 2013).

Grzyb, który nie otrzymuje wystarczającej ilości węgla od swojego gospodarza roślinnego, poprzez połączenie z tzw. wspólną sieć mikoryzową (CMN – ang. common mycorrhizal network) ma możliwość jego pobrania od innej, wydajnej fotosyntetycznie rośliny (Fellbaum i wsp., 2014). CMN bezpośrednio łączy rośliny oddalone nawet o 12 – 20 cm (Wipf i wsp., 2019). CMN sprzyja zrównoważonemu i wydajnemu wykorzystaniu zasobów środowiska, ponieważ składniki odżywcze wytwarzane lub pobrane przez jedną roślinę mogą zostać przekazane przez CMN do rośliny cierpiącej wskutek ich niedoboru, bądź do młodych siewek, zwiększając ich przeżywalność (Bago i wsp., 2003; Corradi i Bonfante, 2012). Poza funkcją odżywczą CMN pełni również funkcję informacyjną. Rośliny przekazują przez CMN fitohormony, np. jasmoniany, ostrzegając sąsiednie rośliny przed potencjalnym atakiem patogenów (Song i wsp., 2010).

AMF, wchodząc w interakcje z mikroorganizmami, a szczególnie z bakteriami ryzosferowymi promującymi wzrost roślin (PGPR – ang. plant growth promoting rhizobacteria), podnoszą żyzność i bioróżnorodność myko-ryzosfery. PGPR (głównie bakterie z rodzajów *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Azotobacter* i *Burkholderia*) bytują licznie w pobliżu lub na powierzchni ERH (Benizri i wsp., 2001; van Overbeek i Saikkonen,

2016). Wśród nich występują liczne bakterie wspomagające rozwój AM (MHB – ang. mycorrhiza-helper bacteria), np. bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, które stymulują kolonizację mikoryzową, wzrost ERH i kiełkowanie spor (Roesti i wsp., 2005; Gamalero i wsp., 2010). Z drugiej strony, AMF wspomagają wzrost MHB wpływając na skład wydzielin korzeniowych oraz dostarczając im znacznych ilości węgla poprzez żywą lub martwą ERH (Hegde i wsp., 1999). Wyniki dotychczasowych eksperymentów wykazały, że AMF i PGPR działają w sposób synergistyczny w stymulowaniu wzrostu gospodarza roślinnego (Vosatka i wsp., 1992; Todeschini i wsp., 2018).

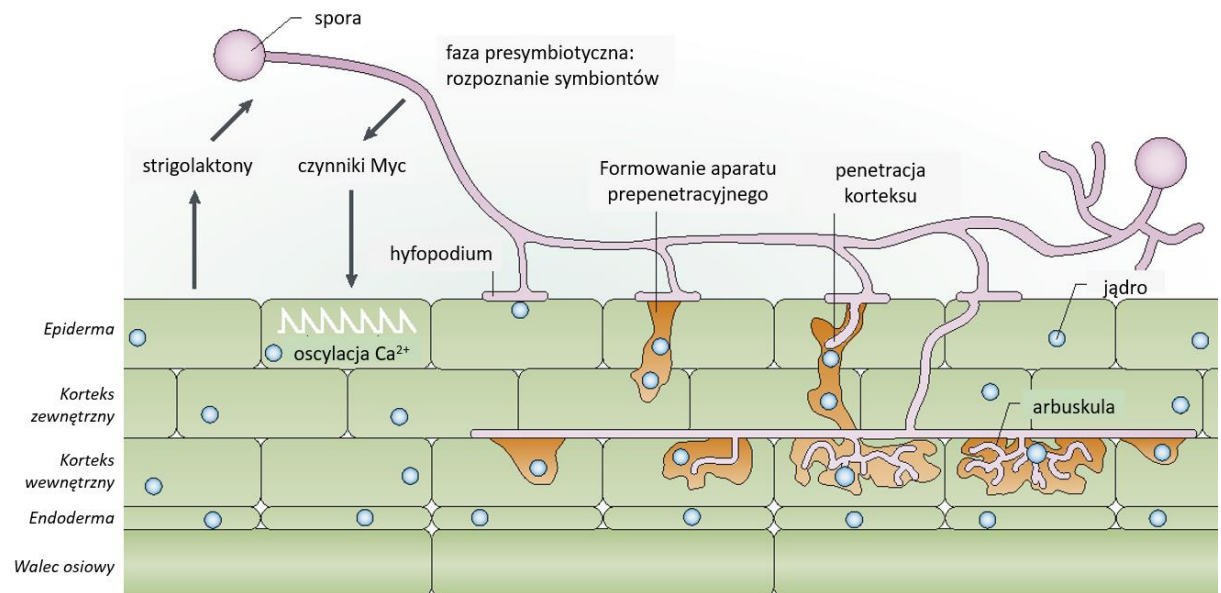
1.5. Rozwój i funkcjonowanie AM

Symbioza AMF z roślinami jest ściśle kontrolowanym i konserwatywnym, lecz uniwersalnym procesem wykształconym na przestrzeni setek milionów lat. Rozpoczyna się fazą presymbiotyczną, w której kiełkująca ze spory AMF strzępka grzybowa, poprzez chemiczny i fizyczny kontakt z powierzchnią korzenia, uruchamia u gospodarza roślinnego kaskadę sygnałów, która z kolei prowadzi do aktywacji systemu regulatorowego. Zespół regulatorów obejmuje czynniki transkrypcyjne, które regulują ekspresję genów systemu symbiotycznego, czyli transporterów i enzymów odpowiedzialnych za reorganizację komórek roślinnych w procesie powstawania arbuskul i wymiany składników odżywczych (Vigneron i wsp., 2018).

1.5.1. Faza presymbiotyczna

Wzajemne rozpoznanie symbionta grzybowego i roślinnego w glebie zachodzi za pośrednictwem specyficznych cząsteczek sygnałowych. Spory AMF są stymulowane do rozwoju przez roślinne strigolaktyny, czyli terpenoidowe laktyny będące pochodnymi karotenoidów. Największe ilości strigolaktyn są wydzielane w warunkach niskiego stężenia składników odżywczych w podłożu oraz suszy (Besserer i wsp., 2006; Lopez-Obando i wsp., 2015). Kiełkująca strzępka AMF wydziela tzw. czynniki Myc, chitoooligosacharydy i lipochitoooligosacharydy, które aktywują u roślin ścieżkę CSP (Maillet i wsp., 2011; Genre i wsp., 2013;). Na powierzchni komórki, czynniki Myc są rozpoznawane przez zespół białek i kinaz receptorowych. Indukują one kaskadę sygnałów prowadzących do zmian stężenia jonów wapnia w jądrze i przestrzeni okołojądrowej (Ryc.

8) (Charpentier i wsp., 2016). Oscylacja stężenia jonów wapnia w jądrze indukuje kinazę CCaMK (ang. calcium–calmodulin-dependent protein kinase), która aktywuje złożoną kaskadę czynników transkrypcyjnych przygotowującą komórkę roślinną na przyjęcie strzępki AMF (Parniske, 2008).



Ryc. 8. Poszczególne etapy rozwoju mikoryzy arbuskularnej (Parniske, 2008).

1.5.2. Formowanie aparatu prepenetracyjnego

Podczas kontaktu z epidermą korzenia strzępka AMF różnicuje się w strukturę adhezyjną zwaną hyfopodium. Kluczową rolę w rozpoznaniu powierzchni korzenia przez AMF odgrywają monomery kutyny (Wang i wsp., 2012). Mechaniczny i chemiczny kontakt symbiontów indukuje proces formowania tzw. aparatu prepenetracyjnego (PPA – ang. prepenetration apparatus). Jądro komórkowe migruje w pobliże hyfopodium, po czym przemieszcza się w głąb komórki, tworząc wyścielony siateczką śródplazmatyczną i stabilizowany przez cytoskielet tunel cytoplazmatyczny. Tak uformowany PPA toruje drogę rosnącej strzępce AMF. Strzępka rozrasta się w apoplacie, a jej boczne rozgałęzienia penetrują komórki kortyka inicjując formowanie trzonów arbuskul (Ryc. 8) (Genre i wsp., 2008).

1.5.3. Formowanie i degeneracja arbuskul

Arbuskula tworzona jest przez dychotomicznie rozgałęzioną IRH, która strukturą przypomina drzewo. Posiada trzon, z którego odchodzą grubsze rozgałęzienia, a z nich kolejno cieńsze. Na początku arbuskula ma formę „ptasiej stopy” z rozgałęzieniami pierwszego rzędu. Dojrzałe arbuskule tworzą obszerną powierzchnię do wymiany składników odżywczych pomiędzy symbiontami (Ryc. 8, 9) (Gutjahr i Parniske, 2013).

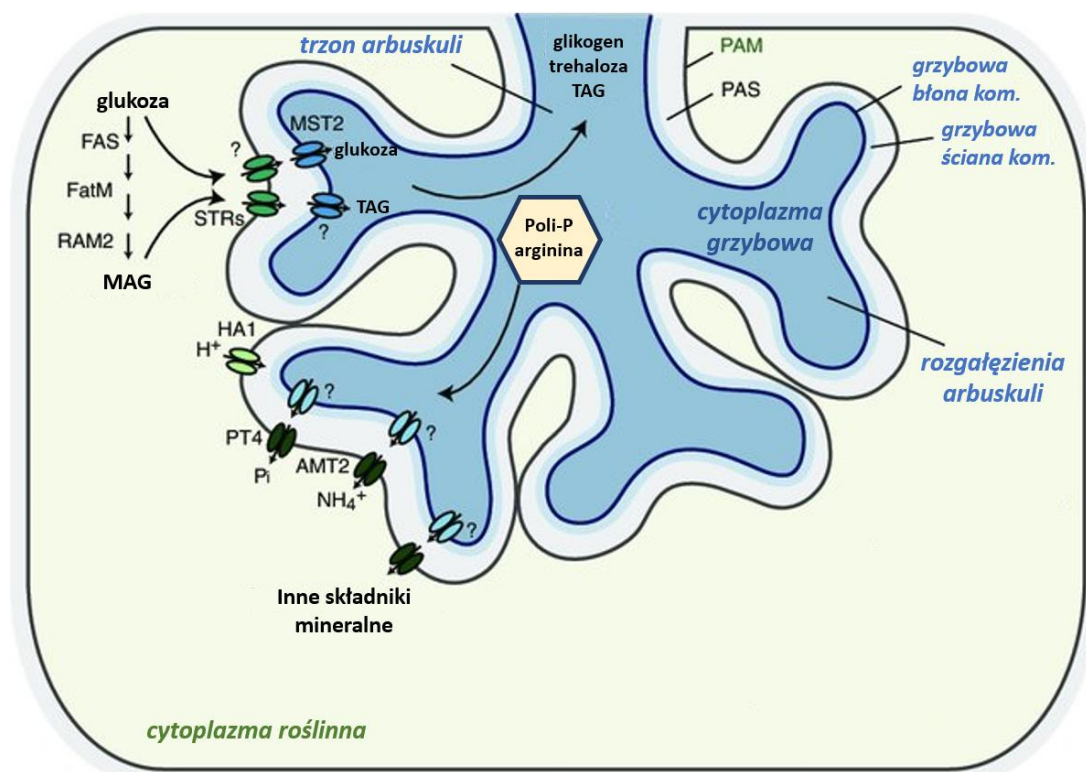


Fig. 9. Arbuskula; schemat transportu składników odżywczych pomiędzy AMF i rośliną (Luginbuehl i Oldroyd, 2017; zmieniono).

W wyniku rozgałęziania IRH, błona komórki korykalnej korzenia ulega inwaginacji tworząc błonę periarbuskularną (PAM – ang. periarbuscular membrane), pozostającą w ciągłości z błoną komórkową (Pumplin i Harrison, 2009). Pomiedzy PAM i IRH występuje wąska przestrzeń periarbuskularna (PAS – ang periarbuscular space), w której H⁺ - ATPazy HA1 dostarczają siły protonomotorycznej do funkcjonowania roślinnych i grzybowych białek transporterowych (Wang i wsp., 2014). Najważniejsze transportery obecne w PAM to: transporter fosforu PT4, transporter amonowy AMT i transportery ABC (ang. ATP – binding cassette transporter) STR (Ryc. 9) (Kobae i wsp., 2010; Gutjahr i wsp.,

2012). W zależności od gatunku rośliny, po upływie 1 - 8,5 doby dochodzi do degeneracji arbuskuli (Luginbuehl i Oldroyd, 2017). U podnóża trzonu arbuskuli tworzy się septa, odcinająca ją od IRH. W degradacji arbuskul i PAM biorą udział hydrolazy oraz peroksosomy (Pumplin i Harrison, 2009; Floss i wsp., 2017).

1.5.4. Wymiana składników odżywczych pomiędzy symbiontami

1.5.4.1. Transport węglowodanów i lipidów z rośliny do grzyba

AMF syntetyzują transportery sacharydów jedynie w IRM, co uzależnia je całkowicie od węgla zapewnionego przez gospodarza roślinnego. Szacuje się, że 4 – 25% zasymilowanego węgla jest transportowana z pędów do korzeni na poczet odżywienia symbionta grzybowego (Hobbie, 2006; Doidy i wsp., 2012). Sacharoza ulega rozkładowi we floemie (Manck-Götzenberger i Requena, 2016) skąd jest transportowana do wnętrza skolonizowanych komórek korzenia i hydrolizowana do glukozy. Glukoza jest eksportowana do PAS, a następnie jest pobierana przez IRM (Ait Lahmidi i wsp., 2016). W IRM glukoza konwertowana jest do glikogenu i trehalozy. W tych formach jest transportowana do ERM, bądź zostaje zmagazynowana w postaci lipidów i glikogenu w sporach i pęcherzykach (Ryc. 9) (Lammers i wsp., 2001; Bago i wsp., 2003).

AMF nie posiadają cytoplazmatycznego kompleksu syntazy kwasów tłuszczowych FAS-I (ang – fatty acid synthase complex I) odpowiadającego za syntezę podstawowych kwasów tłuszczowych u eukariontów, np. palmitynianu. W związku z tym, AMF muszą pozyskać kwasy tłuszczowe syntetyzowane w plastydach skolonizowanych komórek gospodarza roślinnego (Wewer i wsp., 2014). Kwasy tłuszczowe C16:0 są syntetyzowane przez FAS-I i tioesterazę FatM, a następnie konwertowane do monoacylogliceroli (MAG) przez acylotransferazę glicerolo-3-fosforanu RAM2. Przetransportowane do PAS za pomocą transporterów STR monoacyloglicerole zostają przetworzone do triacylogliceroli (TAG), bądź pocięte przez lipazy do wolnych kwasów tłuszczowych, które ulegając protonacji są pobierane przez strzępkę AMF na drodze dyfuzji lub transportu aktywnego. (Ryc. 9). AMF mogą je wykorzystać jako źródło energii w procesie β -oksydacji, składniki budulcowe błony komórkowej, zmagazynować w sporach i pęcherzykach, bądź przekształcić w węglowodory na drodze glukoneogenezy (Rich i wsp., 2017). Oszacowano, iż lipidy stanowią nawet do 95% suchej masy spor AMF, 47% suchej masy ERM i 58% suchej masy pęcherzyków wewnątrzkorzeniowych (Wang i wsp., 2017).

1.5.4.2. Transport fosforu i azotu z grzyba do rośliny

Fosfor i azot są najważniejszymi składnikami odżywczymi dla roślin. Zapotrzebowanie roślin na fosfor może zostać zapewniona przez AMF aż w 70% (Yang i wsp., 2012). AMF absorbują fosfor z gleby za pomocą transporterów obecnych w ERM (Maldonado-Mendoza i wsp., 2001). Jest on następnie transportowany do IRM w formie granul polifosforanowych (Parniske, 2008). Mechanizm uwalniania fosforu przez IRM do PAS jest nieznany. Fosfor zostaje pobrany przez roślinę za pomocą indukowanych mikoryzą transporterów fosforu PT4 obecnych w PAM (Ryc. 9) (Sisaphaithong i wsp., 2012).

Szacuje się, że AMF dostarczają roślinie jedną trzecią całkowitej puli azotu (Govindarajulu i wsp., 2005). Błona ERH wyposażona w specyficzne transportery, pobiera azot nieorganiczny z gleby w postaci jonu amonowego NH_4^+ lub azotanowego NO_3^- , który jest następnie asymilowany w postaci glutaminianu i przekształcany do argininy w cyklu GS/GOGAT (ang. glutamine synthetase/glutamine oxoglutarate aminotransferase) (Calabrese i wsp., 2016; Wang i wsp., 2017). Nośnikiem dodatnio naładowanych cząsteczek argininy do IRM są granule polifosforanowe o ładunku ujemnym (Parniske, 2008). W IRM, arginina jest rozkładana do mocznika i ornityny, po czym mocznik ulega hydrolizie do NH_4^+ , który jest eksportowany do PAS (Govindarajulu i wsp., 2005; Jin i wsp., 2005). NH_4^+ oraz NH_3 pobierane są przez komórkę roślinną za pomocą specjalnych transporterów indukowanych AM zlokalizowanych w PAS (Ryc. 9) (Guether i wsp., 2009; Kobae i wsp., 2010; Breuillin-Sessoms i wsp., 2015). Poza formą mineralną, AMF mogą pobierać również azot organiczny w postaci aminokwasów i krótkich peptydów za pośrednictwem specyficznych permeaz i transporterów peptydowych (Wipf i wsp., 2019).

Pobieranie oraz transfer azotu i fosforu w AM przebiega z udziałem specyficznych mechanizmów, jednakże obecność AMF może również niespecyficznie wspomagać pobieranie przez roślinę potasu, magnezu, wapnia i siarki. W warunkach ich niedoboru obserwuje się wzrost poziomu ekspresji genów kodujących transportery roślinne (np., wymiennika kationów K^+/H^+ czy transporterów siarki) (Wipf i wsp., 2014; Garcia i wsp., 2017). Ponadto, identyfikacja grzybowego transportera cynku w ERM wskazuje na istotną rolę AMF w suplementacji tego pierwiastka u roślin (González-Guerrero i wsp., 2005).

1.6. Znaczenie AMF w ochronie roślin przed stresem abiotycznym

Symbioza z AMF jest jednym z najważniejszych sposobów roślin na radzenie sobie ze stresem. Wykazano, iż AMF cechuje wysoki potencjał adaptacyjny, a lokalne czynniki środowiskowe kształtują ich bioróżnorodność funkcjonalną i gatunkową. Stres stanowi koło napędowe selekcji AMF funkcjonalnie dopasowanych do danego środowiska, promując rozwój mikoryz, w których transfer składników odżywczych zachodzi najefektywniej. Często skutkuje to redukcją różnorodności gatunkowej społeczności AMF. W warunkach znacznego, chronicznego stresu przetrwanie gospodarza roślinnego może zależeć od symbiozy z pojedynczym, zaadaptowanym szczepem AMF, co nasila konkurencję pomiędzy gatunkami w społeczności roślinnej i prowadzi do zubożenia jej bioróżnorodności (Millar i Bennet, 2016). Szczególnie wysokie natężenie czynników stresowych, a zatem, niższa bioróżnorodność AMF, obserwowane są w ekosystemach silnie zaburzonych, np. rolniczych i przemysłowych, gdzie szata roślinna, gospodarka wodna, struktura i żyzność gleby są „zaaranżowane” przez działalność człowieka (Mantri i wsp., 2012).

Jednym z najistotniejszych czynników stresowych w środowisku jest susza. Wpływ AMF na wspomaganie kondycji roślin w stresie suszy i zasolenia został szeroko opisany w literaturze przedmiotu (Bitterlich i wsp, 2018; Duc i wsp, 2018; Ouledali i wsp., 2018). Rośliny skolonizowane przez AMF, poprzez CMN wyposażoną w akwaporyny adsorbują więcej wody i wykazującą sprawniejszą wymianę gazową niż korzenie. AM stymuluje ekspresję genów kodujących roślinne akwaporyny i cykliczne kanały bramkowane nukleotydami, które w kontrolowany sposób transportują i relokują jony Na^+ , K^+ i Ca^{2+} (Ruiz-Lozano i wsp., 2012; Li i wsp, 2013; Rapparini i Peñuelas, 2014; Bitterlich i wsp., 2018). Ponadto, AM wpływa korzystnie na architekturę systemu korzeniowego (Wu i wsp., 2010), usprawnia przepływ apoplastyczny i przewodność hydrauliczną korzeni przy niskim potencjale wodnym (Bárzana i wsp., 2012; Sánchez-Romera i wsp., 2016), wspomaga przewodnictwo szparkowe (Augé i wsp., 2014) i kontroluje transport jonów Na^+ do rośliny (Giri i Mukerji, 2004). AM redukuje także stres osmotyczny wpływając pozytywnie na integralność błon komórkowych i wzrost produkcji osmoprotektantów, takich jak prolina, betaina i kwasy organiczne (Evelin i wsp., 2012; Abdel Latef i Chaoxing, 2014; Talaat i Shawky, 2014). Ogromne znaczenie w kontekście suszy ma również udział AM we właściwej agregacji gleby (Bitterlich i wsp., 2018). Splątana i rozgałęziona CMN funkcjonuje jak rusztowanie, a wydzielana przez nią glomalina, specyficzne hydrofobowe białko, jak spoiwo stabilizujące agregaty glebowe (Miller i Jastrow, 2000; Rillig i Mummey,

2006). CMN sprzyja zachowaniu odpowiedniej porowatości gleby, tworząc sieci mikrokanałów o zachowanej ciągłości i wydajnej przewodności wodnej. Przeciwdziała ona powstawaniu pustek glebowych i zbrylaniu gleby polepszając jej przewodność hydrauliczną i pojemność wodną, a zatem, dostępność roztworu glebowego dla korzeni (Querejeta, 2017).

Temperatura to kolejny czynnik, który wpływa na funkcjonowanie symbiozy pomiędzy roślinami i AMF. Rozwojowi AM sprzyjają temperatury umiarkowane. Wiele doniesień wskazuje na obniżoną kolonizację korzeni i wydajność transferu składników odżywczych w temperaturze poniżej 15°C. W temperaturze powyżej 30°C dochodzi do spadku stopnia kolonizacji korzeni, pogorszenia kiełkowania spor oraz respiracji i wzrostu ERM, podczas gdy w temperaturze powyżej 40°C rozwój AM może zostać zahamowany (Martin i Stutz, 2004; Gavito i wsp., 2005; Heinemeyer i wsp., 2006; Jahromi i wsp., 2008). Mimo to, rośliny mikoryzowe w warunkach stresu termicznego wykazują lepsze odżywienie, nawodnienie, wymianę gazową, sprawność fotosystemów, a także wyższe stężenie chlorofilu i obniżony stres oksydacyjny, w porównaniu do roślin niemikoryzowych (Zhu i wsp., 2010a, 2010b, 2012; Chen i wsp., 2013).

Poza wyższą temperaturą, kolejnym zagrożeniem dla równowagi ekosystemów i symbiotycznych oddziaływań związanym z efektem cieplarnianym jest zbyt wysokie stężenie CO₂ w atmosferze. Wpływ wysokiego stężenia CO₂ na AMF i gospodarza roślinnego jest kwestią indywidualną dla danego środowiska, bądź układu doświadczalnego. Obserwując wzrost kolonizacji mikoryzowej korzeni pod wpływem CO₂ wykazano, iż efekt ten jest silniejszy w przypadku roślin C₄ niż roślin C₃ (Morgan i wsp., 2011). Nawet jeżeli wyższy poziom CO₂ prowadził do redukcji rozwoju IRM i ERM, obserwowano wzrost poboru tlenu z korzeni przez AMF (Maćek i wsp., 2011). Wykazano także, że wyższe stężenie CO₂ może stymulować rozwój AMF z rodzin *Glomeraceae* i *Claroideoglomeraceae*, pozostając bez wpływu na AMF z rodzin *Acaulosporaceae* i *Scutellosporaceae* (Klironomos i wsp., 1998; Staddon i wsp., 2003).

AMF wykazują wysoki potencjał w ochronie roślin przed szkodliwym wpływem wysokich stężeń metali, metali ciężkich i metaloidów. Pod wpływem kolonizacji mikoryzowej obserwuje się zmniejszony pobór metali ciężkich przez korzenie i ich ograniczoną translokację do pędów. Ponadto, AMF obniżają mobilność i biodostępność metali ciężkich w glebie poprzez ich immobilizację przez chitynę, granule polifosforanowe, metalotioneiny i glomaliny obecne w ERM (González-Guerrero i wsp., 2007; Garg i Singla, 2012; Muthukumar i wsp., 2014). Wykazano, że wchodząc w symbiozę

z hiperakumulatorami AMF mogą wspomagać fitoekstrakcję i fitostabilizację metali ciężkich (Turnau i Mesjasz-Przybyłowicz, 2003).

1.7. Potencjał AMF we wspomaganiu fitoremediacji gleb zanieczyszczonych węglowodorami

Fitoremediacja wykorzystuje właściwości roślin i związanych z nimi mikroorganizmów do oczyszczania, rewitalizacji oraz zabezpieczenia środowiska glebowego przed wtórną degradacją. Cieszy się ona coraz większym zainteresowaniem, gdyż fizykochemiczne metody oczyszczania gleb, mimo iż cechują się wysoką efektywnością, są kosztowne i wpływają negatywnie na strukturę i żyzność gleb, obniżając ich potencjał wegetacyjny (Khan i wsp., 2000; Gan i wsp., 2009). Zastosowanie fitoremediacji daje szansę na przywrócenie i stabilizację równowagi ekologicznej środowiska. Rośliny mogą usuwać lub immobilizować zanieczyszczenia obecne w glebie poprzez fitoekstrakcję, fitostabilizację, fitodegradację i fitowolatyлизację. Ogromne znaczenie ma wpływ roślin na stymulację aktywności degradacyjnej mikroorganizmów glebowych (Singh i Jain, 2003). AMF, mimo iż same nie posiadają aktywności degradacyjnej, wykazują znaczny potencjał we wspomaganiu fitodegradacji. AMF efektywnie wspomagają fitoremediację gleb skażonych metalami ciężkimi, węglowodorami ropopochodnymi (TPH – ang. total petroleum hydrocarbons) i wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (PAH – ang. polynuclear aromatic hydrocarbons). Szczególnie wydajne są układy, w których inokulacja AMF stymuluje zarówno wzrost roślin, jak i aktywność mikroorganizmów glebowych (Alarcón i wsp., 2008; Yu i wsp., 2011).

1.7.1. Bioróżnorodność AMF w glebach zanieczyszczonych węglowodorami

Badania kolonizacji mikoryzowej roślin i struktury zespołów AMF w glebach zanieczyszczonych węglowodorami prowadzone w różnych szerokościach geograficznych wskazują na negatywny wpływ wyższych stężeń węglowodorów na rozwój AM i zubożenie bioróżnorodności społeczności AMF. Badając zróżnicowanie AMF na skażonym ropą naftową obszarze Amazonii, Garcés-Ruiz i wsp. (2019) wykazali, że stopień kolonizacji mikoryzowej badanych korzeni wynosił od 44% do 52% w glebie skażonej TPH w stężeniu

>5000 mg kg⁻¹ i 63% w glebie skażonej >1000 mg TPH kg⁻¹. Pomimo dość wysokiego stopnia kolonizacji korzeni, odnotowano bardzo małą ilość arbuskul. Analizując bioróżnorodność AMF w zanieczyszczonej glebie w oparciu o pirosekwencjonowanie fragmentu genu dużej podjednostki rybosomalnego DNA (LSU rDNA – ang. large subunit ribosomal DNA), wykazano silną dominację rodzaju *Acaulospora*, który stanowił 73% społeczności AMF. Wśród pozostałych 27% AMF rozpoznano rodzaje *Archaeospora*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis* i *Kamienskia* (Garcés-Ruiz i wsp., 2019). Wcześniejsze badania przeprowadzone na tym samym terenie, na podstawie analizy biblioteki klonów sekwencji genów małej podjednostki rybosomalnego DNA (SSU rDNA – ang. small subunit ribosomal DNA) – regionu ITS (ang. internal transcribed spacer) – LSU rDNA, wskazały na dominację rodziny *Glomeraceae* (50% AMF w społeczności) oraz znaczący udział rodzin *Acaulosporaceae* (25%) i *Archaeosporaceae* (22%) w społecznościach AMF (Garcés-Ruiz i wsp., 2017). Rozbieżności w kompozycjach społeczności AMF badanych w dwuletnim odstępie mogły wynikać z zastosowania różnych markerów genetycznych, głębokości sekwencjonowania i ilości pobranych prób, a także zmian społeczności w czasie (Garcés-Ruiz i wsp., 2019).

Identyfikacja morfologiczna spor AMF wyizolowanych z gleby skażonej TPH w Meksyku (62 – 181 mg kg⁻¹) wskazała na dominację rodziny *Glomeraceae*. Pozostałe AMF należały do rodzin *Acaulosporaceae* i *Ambisporaceae* (Franco-Ramírez i wsp., 2007). Podobnie, dominację spor z rodziny *Glomeraceae*, z niewielkim udziałem spor AMF przynależnych do rodzajów *Acaulospora* i *Diversispora*, obserwowano w oparciu o sekwencje genów SSU rDNA i ITS na terenie skażonego składowiska odpadów petrochemicznych w Kanadzie (709 – 3590 mg TPH kg⁻¹). Wykazano, że wraz ze spadkiem poziomu skażenia następował spadek ilości spor produkowanych przez AMF z rodzaju *Glomeraceae* i silnej dominacji rodzaju *Diversispora*. Pomimo izolacji spor z ryzosfery bardzo zróżnicowanych filogenetycznie i funkcjonalnie gatunków roślin, *Populus balsamifera*, *Solidago canadensis* i *Lycopus europaeus*, gatunek rośliny miał podrzędne znaczenie w kształtowaniu bioróżnorodności AMF na zanieczyszczonym terenie (Iffis i wsp., 2016). La Providencia i wsp. (2015) badali na tym samym terenie bioróżnorodność AMF w korzeniach innych gatunków roślin, tj. *Eleocharis obtusa* i *Panicum capillare*, wykorzystując wysokoprzepustowe sekwencjonowanie fragmentu genu SSU rDNA. W korzeniach roślin zidentyfikowano 21 operacyjnych jednostek taksonomicznych OTUs (OTUs – ang. operational taxonomic units) wśród których, niezależnie od gatunku

gospodarza roślinnego dominował rodzaj *Rhizophagus*. Odnotowano również znaczny udział AMF z rodzajów *Diversispora*, *Claroideoglossum* i *Paraglossum*. Kolejna analiza prowadzona na tym samym terenie, oparta o sekwencjonowanie genu SSU rDNA, wykazała spadek bioróżnorodności społeczności AMF w skażonej ryzosferze *Salix* spp. W glebie nieskażonej zidentyfikowano 24 OTUs, natomiast w glebie skażonej (709 – 3590 mg TPH kg⁻¹) 17 OTUs. Również w tym przypadku w glebie zanieczyszczonej stwierdzono dominację AMF z rodzaju *Rhizophagus*, które wraz ze spadkiem stężenia TPH ustępowały miejsca AMF z rodzin *Claroideoglossaceae*, *Paraglossaceae* i *Diversisporaceae*.

Ryszka i wsp. (2019), analizowali bioróżnorodność społeczności AMF na obszarze polskich Karpat, w miejscach dawnego wydobycia ropy naftowej lub jej naturalnej infiltracji. Poziom skażenia gleb z badanych stanowisk wynosił 5844 – 102501 mg oleju mineralnego kg⁻¹ i 71 – 221 mg PAH kg⁻¹. Intensywność kolonizacji mikoryzowej korzeni *Ranunculus repens*, rośliny obecnej na większości badanych stanowisk, wynosiła 73% w glebie słabiej skażonej i 23 – 51% na stanowiskach bardziej skażonych. Wzrost stężenia zanieczyszczeń wiązał się ze spadkiem liczby arbuskul w korzeniach z 61% do 11%. Na podstawie sekwencjonowania biblioteki klonów fragmentów genu SSU rDNA z korzeni, nie udało się zidentyfikować filotypów dominujących na badanych terenach. Obok niezidentyfikowanych dominantów, na najbardziej zanieczyszczonych stanowiskach występowały AMF z rodzajów *Claroideoglossum*, *Rhizophagus* i *Diversispora*. Natomiast, stanowiska o niższym stopniu zanieczyszczenia były skolonizowane przez rodzaje *Rhizophagus*, *Acaulospora*, *Archaeospora* i *Diversispora*.

AMF występują na terenach silnie zanieczyszczonych węglowodorami, choć niewielka liczba arbuskul w korzeniach porastających je roślin świadczy o osłabieniu symbiotycznego transferu składników odżywczych. Tworzone przez AMF społeczności charakteryzują się uboższą różnorodnością, z tendencją do dominacji rodziny *Glomeraceae* w najbardziej zanieczyszczonych środowiskach. Dostępne dane dotyczą zaledwie trzech stanowisk zanieczyszczonych ropą naftową w skali całego globu, więc określenie rodziny *Glomeraceae* jako AMF łatwo adaptujących się do rozwoju w środowiskach zanieczyszczonych węglowodorami pozostaje hipotetyczne, dopóki podobne badania nie zostaną przeprowadzone na szerszą skalę. Hipotezę tę wspiera fakt, że *Glomeraceae* są uważane za AMF o wysokich zdolnościach adaptacyjnych do rozwoju w środowiskach zanieczyszczonych metalami ciężkimi. Należąc do „generalistów”, *Glomeraceae* mogą wykazywać tolerancję na różne, organiczne i nieorganiczne rodzaje ksenobiotycznych

zanieczyszczeń środowiska glebowego (Miransari, 2011; Hassan i wsp., 2014; Krishnamoorthy i wsp., 2015;).

1.7.2. Wpływ węglowodorów na rozwój AMF

Wpływ węglowodorów na wzrost i aktywność AMF został wykazany w badaniach polowych, eksperymentach doniczkowych oraz kulturach *in vitro*. Kirk i wsp., (2005) wykazali, że olej napędowy (0,5% w podłożu) wywierał negatywny wpływ na kiełkowanie spor i kolonizację korzeni *R. intraradices* w kulturach korzeni włośnikowatych. Jednakże, nawet wyższe stężenia oleju (0,5 – 3%) nie hamowały kiełkowania spor w skażonej glebie, lecz nieobsadzonej roślinami. Niższa żywotność spor w glebie obsadzonej roślinami mogła wynikać z zaburzeń funkcjonowania presymbiotycznej fazy rozpoznania symbiontów i składu wydzielin korzeniowych, spowodowanych obecnością węglowodorów. Cabello (1997) stwierdziła o 34% niższą intensywność kolonizacji mikoryzowej oraz dwukrotnie niższą liczbę arbuskul w korzeniach *Cynodon dactylon* w środowisku skażonym węglowodorami alifatycznymi (18,5%,), fenantrenem (857,46 mg kg⁻¹) i chryzenem (517 mg kg⁻¹), w porównaniu do roślin pobranych z terenu niezanieczyszczonego. Ponadto, w 100 g gleby skażonej, jedynie 22 spory AMF były zdolne do infekcji korzeni, w porównaniu do 714 aktywnych propagul w 100 g gleby pobranej z miejsca niezanieczyszczonego. W eksperymencie z wykorzystaniem *F. mosseae* i *Phaseolus vulgaris* jako gospodarza roślinnego, w glebie z 2% zawartością ropy naftowej, intensywność kolonizacji mikoryzowej korzeni wyniosła ponad 30%. Przy zwiększeniu zanieczyszczenia do 8% kolonizacja korzeni spadła do 22%, a liczba arbuskul zmniejszyła się dwukrotnie (Nwoko i wsp., 2014). Jeszcze wyższy stopień kolonizacji roślin (60%) i liczbę spor (765 na 100 g gleby) w glebie skażonej TPH (120 mg kg⁻¹) wykazali Franco-Ramírez i wsp. (2007). W innych badaniach wykazano istotny wpływ lotnych frakcji ropy naftowej na żywotność spor *F. mosseae*, *Scutellospora heterogama* i *Glomus ambisporum*, wyizolowanych ze skażonego miejsca. Zdolność spor do kiełkowania obniżyła się o 11 – 30%, a długość ERM zmniejszyła się o 27 – 44%, w porównaniu do spor nie ekspozowanych na ropę. Interesujące wyniki uzyskali Trejo i wsp., (2013), którzy wykazali odmienny wpływ diesla i biodiesla na kolonizację mikoryzową korzeni *Brachiaria decumbens*. Podczas gdy skażenie podłoża zwykłym olejem napędowym w stężeniu 7% spowodowało znaczną redukcję stopnia kolonizacji korzeni, dodatek biodiesla podwoił stopień kolonizacji, w porównaniu do

nieskażonej kontroli. Lotne węglowodory zawarte w oleju napędowym wykazały znaczną szkodliwość, w przeciwieństwie do metylowych i etylowych estrów kwasów tłuszczowych zawartych w biopaliwie. Wyniki przedstawionych badań wskazują, że pomimo iż TPH wpływają supresyjnie na rozwój mikoryzy, poważne obniżenie potencjału mikoryzowego obserwowane jest tylko w warunkach bardzo wysokiego skażenia.

Criquet i wsp. (2000), badając wpływ skażenia gleby antracenenem (250 mg kg^{-1}), nie wykazali jego znacznego wpływu na kolonizację mikoryzową *Medicago sativa* przez *F. mosseae*. Leyval i Binet (1998) również nie odnotowali istotnych zmian w intensywności kolonizacji mikoryzowej życicy przez *F. mosseae*, rosnącej w glebie skażonej aż $5000 \text{ mg antracenu kg}^{-1}$. Do dwukrotnej redukcji stopnia kolonizacji doszło natomiast w glebie skażonej mieszaniną dziesięciu różnych PAH w stężeniach $100 - 1000 \text{ mg kg}^{-1}$. Doświadczenie polowe z glebą skażoną $4000 \text{ mg PAH kg}^{-1}$ wykazało, że wpływ zanieczyszczenia na kolonizację mikoryzową zależał od gatunku gospodarza roślinnego. Kolonizacja mikoryzowa roślin jednoliściennych, *Zea mays* i *Lolium perenne*, nie uległa zmianie pod wpływem skażenia, podczas gdy kolonizacja dwuliściennych, *Allium porrum* i *Trifolium repens*, została drastycznie obniżona (Leyval i Binet, 1998). Zatem, szkodliwość wpływu PAH na rozwój AM może zależeć nie tylko od stężenia zanieczyszczeń, ale od ilości różnych PAH w skażonym środowisku, a ponadto od funkcjonalnego doboru symbiontów.

Pomimo, iż nie wykazano szkodliwości antracenu w środowisku glebowym, wrażliwość AM na ten związek obserwowano w kulturach *in vitro*. Verdin i wsp. (2006), wykazali redukcję stopnia kolonizacji korzeni cykorii przez *R. irregularis* z 50% do 15%, pod wpływem zarówno niskiego (30 mg L^{-1}), jak i wysokiego (140 mg L^{-1}) skażenia podłoża antracenenem, w porównaniu do kultur nieskażonych. Niższe stężenie antracenu spowodowało dziesięciokrotną redukcję długości ERM i liczby wytwarzanych spor, podczas gdy wyższe stężenie spowodowało aż trzydziestokrotny spadek długości ERM i stukrotny spadek liczby spor. Pomimo tego, obecność mikoryzy zwiększyła tolerancję korzeni cykorii na skażenie antracenenem stymulując aktywność peroksydazy w jej tkankach (Verdin i wsp., 2006). Debiane i wsp. (2008, 2009), stosując podobny system hodowli, badali wpływ trójpierścieniowego antracenu i pięciopierścieniowego benzo[a]pirenu na rozwój i parametry fizjologiczne *R. irregularis*. Oba związki, a w szczególności benzo[a]piren, znacznie zredukowały długość ERM, liczbę wytwarzanych spor i intensywność kolonizacji korzeni, świadcząc o wzroście toksyczności PAH wraz z ilością pierścieni w cząsteczce. Obserwowane efekty były skorelowane ze stężeniem badanych węglowodorów w podłożu.

Największe stężenie badanych PAH (280 μM) spowodowało wzrost peroksydacji lipidów, wpływając na obniżenie całkowitej zawartości lipidów w ERM. Odnotowano także spadek zawartości fosfolipidów i steroli, przy jednoczesnej wzmożonej biosyntezie fosfatydylocholiny i triacylogliceroli oraz wzroście aktywności lipazy. Świadczyło to o wykorzystaniu zmagazynowanych lipidów na potrzebę intensywnej regeneracji błon komórkowych (Debiane i wsp., 2008, 2009; Calonne i wsp., 2014a). Ponadto, PAH miały negatywny wpływ na transport fosforu z grzyba do rośliny, o czym świadczył spadek aktywności fosfatazy kwaśnej i zawartości fosforu w korzeniach. Jednocześnie, brak zmian w poziomie ekspresji genów transportera fosforu *GiPT* i fosfatazy alkalicznej *GiALP* wskazywały na niezakłócone pobieranie fosforu z podłoża (Calonne i wsp., 2014b). Antracen i benzo[a]piren wywołały stres oksydacyjny w korzeniach cykorii, o czym świadczyła wysoka koncentracja malonylodialdehydu (MDA) i 8-hydroksy-20-deoksyguanozyny (8-OHdG). Poziom MDA i 8-OHdG był znacznie niższy w obecności mikoryzy sugerując aktywny udział AMF w zmniejszeniu poziomu stresu oksydacyjnego u roślin wywołanego PAH (Debiane i wsp., 2008, 2009, 2011). Wysoka toksyczność benzo[a]pirenu, szczególnie w wyższych stężeniach (do 100 mg kg^{-1}), została potwierdzona w doświadczeniach glebowych, w których obserwowano jego negatywny wpływ na intensywność kolonizacji mikoryzowej korzeni, żywotność spor, długość ERM i aktywność fosfatazy alkalicznej (Liu i wsp., 2004; Alarcón i wsp., 2006b; Franco-Ramírez i wsp., 2007). Badania przeprowadzone przez Aranda i wsp. (2013) potwierdziły niższą szkodliwość antracenu dla AMF, w porównaniu do fenantrenu i dibenzotiofenu, które również są związkami trójpierścieniowymi, jednak o odmiennym układzie pierścieni. Wraz ze wzrostem stężenia tych związków w podłożu (120 – 240 μM) obserwowano nasilenie efektu toksycznego i spadek intensywności kolonizacji korzeni, liczby arbuskul, długości ERM i liczby spor produkowanych przez *Rhizophagus custos*. Wysoką toksyczność fenantrenu względem spor *F. mosseae*, *G. ambisporum* i *S. heterogama*, wyizolowanych ze środowiska skażonego PAH, wykazali również Franco-Ramírez i wsp. (2007). Fenantren w stężeniu 25 mg i 100 mg L^{-1} redukował zdolność spor do kiełkowania, odpowiednio dwu- i sześciokrotnie. W eksperymencie doniczkowym, dodatek 100 $\text{mg fenantrenu kg}^{-1}$ spowodował spadek intensywności kolonizacji mikoryzowej korzeni kukurydzy przez *Funneliformis geosporum* o 20% i niemal dwukrotny spadek aktywności dehydrogenazy bursztynianowej w IRM, w odniesieniu do nieskażonej kontroli (Gaspar i wsp., 2002).

1.7.3. Fitoremediacja gleb skażonych węglowodorami wspomagana AMF

Wspomaganie wydajności fitoremediacji węglowodorów oraz ich pochodnych przez AMF opiera się na trzech głównych mechanizmach: lepszym odżywieniu, ochronie i wspomaganiu wzrostu roślin, zwiększeniu potencjału degradacyjnego mikroorganizmów ryzosferowych, a także stymulacji adsorpcji i akumulacji zanieczyszczeń przez korzenie.

Jedną z przyczyn zaburzeń wzrostu roślin w glebach zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi jest zaburzone pobieranie wody i składników odżywczych. Jest to efekt formowania przez węglowodory hydrofobowej, trudno przepuszczalnej bariery na cząsteczkach gleby i korzeniach. Mikoryza może zmniejszać negatywne oddziaływanie węglowodorów poprzez zwiększenie wydajności pobierania składników odżywczych i wody. Rabie i wsp. (2005) odnotowali trzykrotnie wyższe nawodnienie biomasy *Triticum aestivum* i *Vigna radiata* rosnących w glebie skażonej mieszaniną PAH, pod wpływem kolonizacji przez *F. mosseae*. Liu i Dalpé (2009), stosując *Glomus versiforme* i *R. intraradices* do inokulacji *A. porrum* w glebie skażonej fenantrenem i antracenenem, obserwowali wzrost pobierania azotu i fosforu, a w efekcie zwiększenie biomasy roślin. Przełożyło się to na znacznie bardziej wydajny spadek zawartości antracenu i fenantrenu w podłożu, o odpowiednio 9 – 31% i 43 – 99%, w porównaniu do stężenia początkowego. Inne badania również potwierdziły użyteczność AMF we wspomaganiu wzrostu roślin w warunkach skażenia węglowodorami, wykazując pozytywny wpływ AM na takie parametry jak: wzrost biomasy (Wu i wsp., 2011; Yu i wsp., 2011; Trejo i wsp., 2013; Nwoko, 2014; Lu i Lu, 2015), zwiększenie długości korzeni i pędów (Cabello, 1999; Joner i Leyval, 2003; Debiane i wsp., 2008; Aranda i wsp., 2013), wzrost pobierania azotu i fosforu (Cabello, 1999; Joner and Leyval, 2001; Hernández-Ortega i wsp., 2012; Zhou i wsp., 2013) i wzrost zawartości chlorofilu (Nwoko, 2014). AMF, które najefektywniej wpływały na poprawę kondycji roślin należały do gatunków *F. mosseae*, *Funneliformis caledonium*, *Rhizophagus fasciculatus*, *R. custos* i *R. irregularis*.

Jak wskazują wyniki wielu badań, AMF prezentują znaczny potencjał we wspomaganiu ryzodegradacji węglowodorów, wpływając nie tylko na wzrost i aktywność metaboliczną samych roślin, lecz na całe środowisko mykoryzosferowe. Zarówno żywe ERM, aktywnie dostarczające prostych źródeł węgla i glomaliny, jak i martwe ERM, zwiększające glebową nekromasę, tworzą środowisko sprzyjające aktywności mikroorganizmów biodegradowujących węglowodory i PGPR (Rillig i wsp., 2001; Toljander i wsp., 2007). Wydzielana przez AMF hydrofobowa glomalina może zwiększyć biomasę

mikroorganizmów nawet dwudziestokrotnie, jednocześnie zwiększając biodostępność węglowodorów dla mikroorganizmów (Rillig i wsp., 2001; Gadkar i Rillig, 2006). Kolonizując korzenie roślin, AMF mogą wpływać na skład i ilość produkowanych przez nie wydzielin. Mykoryzosfera jest bogata w roślinne enzymy i metabolity, takie jak związki fenolowe, rozpuszczalny węgiel organiczny i niskocząsteczkowe kwasy organiczne, które stymulują aktywność degradacyjną mikroorganizmów (Singer i wsp., 2003; Wu i wsp., 2011). AMF zwiększają aktywność i wydzielanie szeregu roślinnych oksydoreduktaz takich jak: dehydrogenaza, katalaza, oksydaza polifenolowa, dysmutaza nadtlenukowa, peroksydazy i dioksygenazy (Criquet i wsp., 2000; Rabie, 2005; Corgié i wsp., 2006; Debiante i wsp., 2009; Huang i wsp., 2009; Xiao i wsp., 2009; Lu i Lu, 2015; Lenoir i wsp., 2016). Oksydoreduktazy te biorą udział w utlenianiu i degradacji PAH, jednocześnie chroniąc rośliny przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego (Joner i Leyval, 2003).

Dowodów na efektywność ryzodegradacji wspomaganej AMF dostarczyły wyniki eksperymentów przeprowadzonych na glebie skażonej węglowodorami, poddanej fitoremediacji z udziałem roślin mikoryzowych i niemikoryzowych. Wprowadzenie AMF do układów skażonych węglowodorami prowadziło do wzrostu ogólnej biomasy bakterii i grzybów saprofitycznych, w tym bakterii degradujących węglowodory, oraz skutkowało wzrostem aktywności enzymatycznej w glebie (Corgié i wsp., 2006; Małachowska-Jutcz i wsp., 2011; Zhou i wsp., 2013). W układach fitoremediacyjnych skażonych ropą naftową i inokulowanych AMF z rodziny *Glomeraceae* osiągnęto dwukrotny spadek stężenia TPH w podłożu, w stosunku do stężenia początkowego (Hernández-Ortega i wsp., 2012; Nwoko, 2014). Potencjał AMF we wspomaganiu fitoremediacji wykazano również w układach skażonych PAH. Inokulacja *F. mosseae* przyczyniła się do redukcji stężenia chryzenu (500 mg kg⁻¹) i dibenzo[a,h]antracenu (50 mg kg⁻¹) o odpowiednio, 10% i 22% w glebie obsadzonej *L. perenne* i *T. repens*, w porównaniu do układów niemikoryzowych (Joner i wsp., 2001). Mikoryza tworzona przez *F. mosseae* przyczyniła się również do większego (o 45 – 73%) ubytku antracenu, pirenu i chryzenu (500 mg kg⁻¹) w glebie obsadzonej *V. radiata* lub *T. aestivum* (Rabie, 2005). *F. mossae* i *Claroideoglomus etunicatum*, we współpracy z *M. sativa*, spowodowały ubytek fenantrenu (103 mg kg⁻¹) i pirenu (73 mg kg⁻¹) w glebie o 63,5% i 47%, w porównaniu do układów nie inokulowanych AMF (Gao i wsp., 2011). Lenoir i wsp. (2016) wykazali, że degradacja węglowodorów w glebie skażonej alkanami (1285,2 mg kg⁻¹) i PAH (78,2 mg kg⁻¹) przebiegała najefektywniej w układach trójskładnikowych obejmujących rośliny, bakterie i AMF. Po szesnastu tygodniach trwania

eksperymentu, stężenie alkanów i PAH w sterylnej glebie obsadzonej *T. aestivum* wyniosło odpowiednio, 624,4 mg kg⁻¹ i 55,3 mg kg⁻¹. W glebie niesterylizowanej obsadzonej *T. aestivum* stężenie alkanów i PAH wyniosło 440 mg kg⁻¹ i 43,4 mg kg⁻¹, natomiast w układzie niesterylnym z *T. aestivum*, inokulowanym *R. irregularis*, stężenie alkanów spadło aż do 401 mg kg⁻¹, a PAH do 38,9 mg kg⁻¹. Wykazano, że rozwój mikoryzy spowodował wzrost biomasy bakterii Gram-ujemnych i Gram-dodatnich o odpowiednio, 37% i 56%, w porównaniu do układów niemikoryzowych (Lenoir i wsp., 2016). Alarcón i wsp. (2008) opracowali efektywny układ fitoremediacyjny gleby skażonej ropą naftową (6000 mg kg⁻¹) składający się z *Lolium multiflorum*, *R. intraradices* i mikroorganizmów degradujących węglowodory ropopochodne: grzyba *Cunninghamella echinulata* i bakterii *Sphingomonas paucimobilis*. W układzie z dodatkiem samych AMF nie odnotowano znaczącego ubytku zanieczyszczeń, natomiast w układzie z AMF, *C. echinulata* i *S. paucimobilis* obserwowano ubytek zawartości ropy w podłożu o 59% (Alarcon i wsp., 2006a, 2008). W innym eksperymencie z *L. multiflorum*, wprowadzenie bakterii *Acinetobacter* sp. stymulowało kolonizację korzeni przez *F. mosseae* i podwyższyło aktywność peroksydazy, co przełożyło się na niemal całkowitą degradację fenantrenu i pirenu w podłożu, wprowadzonych do gleby w stężeniu początkowym 50 – 200 mg kg⁻¹ (Yu i wsp., 2011). Inne symbiotyczne układy fitoremediacyjne zastosowane do usuwania antracenu i fenantrenu potwierdziły, iż wprowadzenie AMF z gatunków *F. mosseae*, *G. versiforme* czy *R. intraradices* do gleby wzbogaconej bakteriami degradującymi węglowodory, może wspomóc wydajność biodegradacji PAH o co najmniej 10% (Cheung i wsp., 2008; Liu i Dalpé, 2009). Wysoki potencjał fitoremediacyjny wykazały również układy z AMF i bakteriami brodawkowymi, w których AMF wspomagając nodulację, zwiększały pobór azotu przez rośliny. Z kolei, bakterie brodawkowe stymulowały kolonizację mikoryzową korzeni (Houngnandan i wsp., 2001; Mortimer i wsp., 2008; Teng i wsp., 2010). Po wprowadzeniu AMF z rodziny *Glomeraceae* do gleby obsadzonej *Melilotus albus*, zaobserwowano wzrost liczby brodawek korzeniowych oraz osiągnięto wzrost degradacji TPH o 10% (Hernández-Ortega i wsp., 2012). Poza mikroorganizmami, AMF mogą również współdziałać z fauną glebową. W glebie skażonej PAH, inokulacja *F. mosseae* nie tylko zwiększyła liczbę bakterii degradujących węglowodory, lecz także żywotność dżdżownic i aktywność oksydazy polifenolowej. Z kolei, dżdżownice przyczyniły się do wzrostu stopnia kolonizacji mikoryzowej korzeni *Festuca arundinacea*. W tym wieloskładnikowym układzie fitoremediacyjnym odnotowano spadek stężenia

węglowodorów o 93,4%, podczas gdy w układzie z samymi roślinami, jedynie o 31,6%, w stosunku do ich stężenia początkowego (Lu i Lu, 2015).

W związku z utrudnioną translokacją PAH do części nadziemnych roślin, dochodzi do ich akumulacji w lipofilowych kompartmentach komórek korzeni (Sikkema i wsp., 1994; Harvey i wsp., 2002). Badania wykazały, że AMF zwiększają mobilizację i akumulację PAH w obrębie korzeni, jednakże proces ten nie jest na tyle efektywny aby usunąć znaczącą frakcję PAH z gleby (Wu i wsp., 2009, 2011; Gao i wsp., 2011; Yu i wsp., 2011; Lu i Lu, 2015; Lenoir i wsp., 2016). Na przykładzie *Z. mays*, *T. aestivum* i *V. radiata* wykazano, że AM może trzykrotnie zwiększyć adsorpcję PAH przez korzenie, w porównaniu do roślin niemikoryzowych. Jednakże, ilość PAH związanych z korzeniami stanowiła co najwyżej 6% początkowej zawartości PAH w glebie (Rabie, 2005; Gao i wsp., 2011; Lenoir i wsp., 2016). W innych przypadkach, nawet jeżeli mikoryza wpływała na zwiększenie poboru PAH przez korzenie, to hamowała ich translokację do pędów, immobilizując PAH w komórkach epidermy i korteksu korzenia (Rabie, 2005; Gao i wsp., 2011; Yu i wsp., 2011). Większa akumulacja PAH przez korzenie mikoryzowe wynika z wysokiej zawartości lipidów w strzępce AMF (Verdin i wsp., 2006). Wykazano, że współczynnik podziału fenantrenu i fluorenu pomiędzy ERM i roztworem glebowym był wyższy o około 300%, niż pomiędzy korzeniami a roztworem glebowym (Gao i wsp., 2010).

1.7.4. Czynniki wpływające na efektywność fitoremediacji wspomaganej AMF

Na efektywność fitoremediacji wspomaganej AMF wpływa szereg czynników, takich jak: stężenie i struktura molekularna węglowodorów, właściwości fizykochemiczne i zawartość składników odżywczych w glebie, funkcjonalne dopasowanie symbionta grzybowego i roślinnego oraz ich tolerancja na obecność zanieczyszczeń. Fitodegradacja PAH może dać niezadawalające rezultaty, jeżeli zanieczyszczenia występują w toksycznych stężeniach zaburzających wzrost roślin i rozwój AM (Debiane i wsp., 2011; Yu i wsp., 2011; Aranda i wsp., 2013). Stopień toksyczności i oporności węglowodorów na degradację może zwiększać się wraz ze wzrostem ich masy molekularnej. Największą podatność na biodegradację i jednocześnie najmniejszą toksyczność w eksperymentach fitoremediacyjnych z udziałem AMF odnotowano dla PAH trójpierścieniowych, takich jak antracen i fenantren. Usunięcie czteropierścieniowego pirenu z oczyszczanego środowiska było dużo trudniejsze, lecz stopień jego degradacji zwiększono poprzez wprowadzenie do

układu doświadczalnego trójpierścieniowych PAH (Liu i Dalpé, 2009; Gao i wsp., 2011; Yu i wsp., 2011; Aranda i wsp., 2013; Zhou i wsp., 2013). Najślabiej biodegradowalne były PAH zawierające pięć i więcej pierścieni, np. benzo[a]piren czy dibenzo[a,h]antracen, lecz efektywność ich fitoremediacji również zwiększono dzięki AM. W zależności od układu eksperymentalnego, wprowadzenie AMF wiązało się ze zwiększonym o 10 – 60% ubytkiem ich stężeń w podłożu (Liu i wsp., 2004; Lu i Lu, 2015).

Istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność fitoremediacji wspomaganej AMF jest funkcjonalne dopasowanie symbiontów (Davison i wsp., 2011; Hart i wsp., 2013). Największą wydajność w usuwaniu zanieczyszczeń uzyskano wykorzystując AMF wyizolowane z zanieczyszczonych środowisk, zaadaptowane do rozwoju w obecności węglowodorów. Wiele eksperymentów fitoremediacyjnych ogranicza się do badania efektywności modelowych, komercyjnie dostępnych szczepów AMF, reprezentujących głównie jedną rodzinę, *Glomeraceae* (Cabello, 1999; Binet, 2000; Cheung i wsp., 2008; Yu i wsp., 2011). Konieczne jest wprowadzenie do badań autochtonicznych AMF i opracowanie układów fitoremediacyjnych dostosowanych do określonych warunków środowiskowych. Równie ważny jest wybór odpowiedniego partnera roślinnego, gdyż różne gatunki roślin wykazują odmienną wrażliwość na zanieczyszczenia oraz kolonizację przez ten sam szczep AMF. Leyval i Binet (1998) obserwowali negatywny wpływ skażenia PAH na kolonizację mikoryzową roślin dwuliściennych, *Trifolium subterraneum* i *A. porrum*, czego nie wykazali w przypadku jednoliściennych, *Z. mays* i *L. perenne*. Rabie (2005) wykazał wysoką efektywność fitoremediacji wspomaganej *F. mosseae* z udziałem *T. aestivum* i *V. radiata*, lecz nie z udziałem *Solanum melongea*. Zhou i wsp. (2013) otrzymali pozytywne wyniki fitoremediacji podłoża skażonego fenantrenem z wykorzystaniem *M. sativa*, *F. arundinacea*, *L. multiflorum* i *Apium graveolens*, jednakże tylko *M. sativa* wykazał znaczną efektywność w przypadku skażenia pirenem i dibenzo[a,h]antracenenem. Ponadto, zastosowanie mieszanki dwóch gatunków, *M. sativa* i *F. arundinacea*, dało lepsze rezultaty, w porównaniu do roślinnych monokultur (Zhou i wsp., 2009, 2013).

Czynnikiem kluczowym dla optymalnego funkcjonowania AM jest umiarkowane nawożenie, tak aby pobór składników odżywczych za pośrednictwem AMF był dla rośliny bardziej opłacalny niż bezpośredni pobór fosforu z gleby (Schnepf i wsp., 2008; Smith i wsp., 2011). W badaniach nad fitodegradacją dibenzo[a,h]antracenu z udziałem AMF, najlepsze efekty uzyskano przy niskiej zawartości fosforu w glebie i wysokim nawodnieniu

(Zhou i wsp., 2009). Optymalne nawodnienie jest wysoce istotne dla mobilizacji PAH. Słabe nawodnienie spowalnia masowy przepływ zanieczyszczeń w kierunku ryzosfery obniżając ich biodegradację. Z kolei, nadmiar wody hamuje dyfuzję tlenu, który jest wymagany do najbardziej wydajnego, tlenowego rozkładu PAH, do głębszych warstw gleby (Phillips i wsp., 2000; Johnsen i wsp., 2005).

2. Cel pracy i hipoteza badawcza

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu fenolu i PAH na kolonizację mikoryzową korzeni roślin *Poa trivialis* i *Phragmites australis*, biomasę i bioróżnorodność AMF, biomasę bakterii i grzybów saprofitycznych oraz poziom stresu oksydacyjnego w roślinach i sporach AMF. Kolejnym celem była ocena możliwości wykorzystania inokulum mikoryzowego do poprawy wzrostu i kondycji roślin narażonych na zanieczyszczenia.

W trakcie badań weryfikowano postawione hipotezy badawcze:

1. Skażenie środowiska fenolem i PAH wpływa negatywnie na kolonizację mikoryzową korzeni roślin, liczbę spor i długość mycelium zewnątrzkorzeniowego AMF w glebie, a także na zawartość neutralnego kwasu tłuszczowego 16:1 ω 5c oraz białek spokrewnionych z glomalinami w glebie.
2. Społeczności AMF na terenie zanieczyszczonym fenolem i PAH są zdominowane przez AMF należące do rodziny *Glomeraceae*.
3. Gatunki AMF wyizolowane w kulturach pułapkowych reprezentują gatunki dominujące w badanych społecznościach AMF.
4. Skażenie podłoża wzrostowego fenolem i PAH ma negatywny wpływ na wysokość i biomasę roślin, a także zwiększa poziom stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych w ich tkankach.
5. Wykorzystanie jednogatunkowego i wielogatunkowego inokulum mikoryzowego ma pozytywny wpływ na wzrost i biomasę roślin oraz poziom stresu oksydacyjnego i aktywność enzymów antyoksydacyjnych w ich tkankach, zarówno w kulturach skażonych fenolem i PAH, jak i nieskażonych.

Hipotezy badawcze sprawdzano poprzez realizację następujących zadań badawczych:

1. Ocena stopnia kolonizacji mikoryzowej korzeni oraz liczby spor i długości mycelium zewnątrzkorzeniowego AMF, zawartości neutralnego kwasu tłuszczowego 16:1 ω 5c i białek spokrewnionych z glomalinami w glebie okołokorzeniowej z roślin pobranych z terenu zanieczyszczonego fenolem i PAH oraz z niezanieczyszczonego terenu kontrolnego.
2. Ocena biomasy głównych grup mikroorganizmów glebowych.
3. Charakterystyka bioróżnorodności społeczności AMF związanych z korzeniami roślin i glebą okołokorzeniową na terenie zanieczyszczonym i terenie kontrolnym.
4. Izolacja gatunków AMF dominujących w społecznościach AMF obu terenów.

5. Sprawdzenie wpływu fenolu i PAH na rozwój AMF wyizolowanych z terenu zanieczyszczonego i ich potencjał we wspomaganiu wzrostu *Lolium perenne* w warunkach laboratoryjnych, poprzez analizę stopnia kolonizacji mikoryzowej korzeni, ilości wytworzonych spor, biomasy i wysokości roślin, a także poziomu stresu oksydacyjnego oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych, zarówno w tkankach roślinnych, jak i w sporach AMF.

3. Materiały i metody

3.1. Materiały

3.1.1. Pobór i przygotowanie prób do badań

Do badań biomasy i bioróżnorodności AMF oraz izolacji AMF ze środowiska, pobrano rdzenie glebowe, wraz z systemem korzeniowym dwóch gatunków roślin, *Poa trivialis* i *Phragmites australis*. Gatunki te dominowały w szacie roślinnej nadbrzeża dwóch stawów: stawu Kalina, zanieczyszczonego fenolem i węglowodorami oraz stawu Kokotek II, stanowiącego niezanieczyszczony teren kontrolny. Z każdego miejsca i każdego gatunku rośliny pobrano 12 prób.

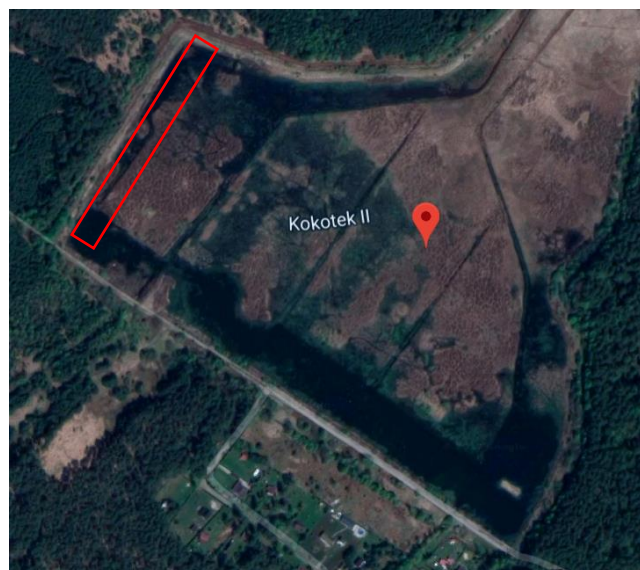
Staw Kalina zlokalizowany w Świętochłowicach w Województwie Śląskim (50°16'49" N, 18°55'38" E), wraz z terenem otaczającym, został trwale skażony fenolem i PAH w wyniku przeciekania niezabezpieczonej, sąsiadującej z nim hałdy odpadów toksycznych. Do największego skażenia terenu doszło w latach 50 i 60 ubiegłego wieku w wyniku działalności Zakładów Chemicznych „Hajduki”. Pierwszych, nieudanych prób rekultywacji i oczyszczenia stawu podjęto się w latach 90. Otoczenie jest obecnie spontanicznie i obficie porośnięte roślinnością (Ryc. 10. A, B). Jako teren referencyjny wybrano Staw Kokotek II, zlokalizowany w Lublińcu w Województwie Śląskim (50°37'14" N, 18°43'46" E), który nie był i nie jest narażony na zanieczyszczenia przemysłowe. Obszar nadbrzeża obu stawów charakteryzował zbliżony skład granulometryczny gleby oraz szata roślinna zdominowana przez *Ph. australis* i *P. trivialis* (Ryc. 11).

Pobrane korzenie roślin ręcznie otrząśnięto z luźnej gleby, którą przechowywano w 4°C w celu analizy zawartości fenolu i PAH, lub wysuszono w temp. pokojowej i przesiano przez sito o średnicy oczek 2 mm, w celu analizy składu granulometrycznego, pH, zawartości materii organicznej (SOM – ang. soil organic matter) oraz ogólnej zawartości azotu. Glebę ryzosferową i luźno przywierającą do korzeni uzyskano poprzez mechaniczne wytrząsanie korzeni w 0.9% NaCl przez 30 min, przy 120 rpm. Roztwór glebowy zwirowano przy 4000 × g przez 20 min, po czym pelet przechowywano w -20°C. Korzenie zostały dokładnie oczyszczone pod bieżącą wodą i pocięte na 1 – 1,5 cm fragmenty. W celu oceny stopnia kolonizacji mikoryzowej przechowywano je w 4°C w 70% etanolu. Fragmenty korzeni przeznaczone do izolacji DNA przechowywano w -20°C. Fragmenty systemu

korzeniowego wraz z przylegającą glebą, przeznaczone do izolacji szczepów AMF, przechowywano szczelnie zapakowane w 4°C przez maksymalnie dwa tygodnie.



Ryc. 10. A. Obszar stawu Kalina i hałdy odpadów toksycznych w Świątchłowicach. Prostokątem oznaczono obszar poboru prób (<https://www.google.com/maps/place/Kalina>). **B.** Przykładowy punkt poboru (zdjęcie własne).



Ryc. 11. Obszar Stawu Kokotek II w Lublińcu. Prostokątem oznaczono obszar poboru prób (<https://www.google.com/maps/place/Kokotek+II>).

3.2. Metody

3.2.1. Charakterystyka fizykochemiczna gleby

Analiza granulometryczna gleby została wykonana metodą areometryczną w oparciu o normę PN-R-04032. Wilgotność gleby oznaczono metodą grawimetryczną wg. normy ISO 16586:2003 z zastosowaniem wagosuszarki Radwag AMX50/1/WH. Odczyn gleby został zmierzony pH-metrem Elmetron CP-411 w roztworze wodnym oraz 1 M KCl (1:5, w/v) zgodnie z normą ISO 10390:2005. Ten sam roztwór wodny użyto do pomiaru przewodności gleby konduktometrem Elmetron CC-511 wg. normy ISO 11265:1994. Zawartość SOM została oznaczona metodą strat prażenia w 550°C wg. normy PN-EN 15935:2013-02. Zawartość azotu ogólnego w glebie oznaczoną metodą Kjeldahla wg. normy PN-ISO 11261:2002. Ekstrakcję fenolu z gleby prowadzono przez 24 godziny z użyciem mieszaniny acetonu i heksanu (1:1, v/v) z zastosowaniem aparatu Soxhleta. Uzyskany ekstrakt został zatężony do 1 – 2 mL na wyparce rotacyjnej Hei-VAP Advantage (Heidolph Instruments, Schwabach, Niemcy), rozcieńczony 2-propanolem do 50 mL i ponownie zatężony do ok. 10 mL. Następnie, ekstrakt został zatężony do 1 mL poprzez suszenie w strumieniu azotu w łaźni wodnej w temp. 35°C. Stężenie fenolu w ekstraktach zostało oznaczone na chromatografii gazowej 7820A (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornia, Stany Zjednoczone) zaopatrzoną w kolumnę Restek Rxi®-5 ms (Restek, Bellefonte, Pensylwania, Stany Zjednoczone) i detektor płomieniowo-jonizacyjny, zgodnie z normą EPA 8041A. Oznaczenie stężenia PAH w glebie przeprowadzono zgodnie z normą PN-ISO 13877:2004. PAH ekstrahowano z gleby poprzez wytrząsanie w acetonie i eterze naftowym. Ekstrakt zatężono na wyparce rotacyjnej do 10 mL, a następnie w strumieniu azotu w temp. pokojowej do 1 mL. Stężenie PAH w ekstraktach oznaczono z zastosowaniem wysokosprawnego chromatografu ciekłego LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japonia) zaopatrzonego w kolumnę Supelcosil™ LC-PAH (Supelco, Bellefonte, Pensylwania, Stany Zjednoczone) oraz detektor diodowy.

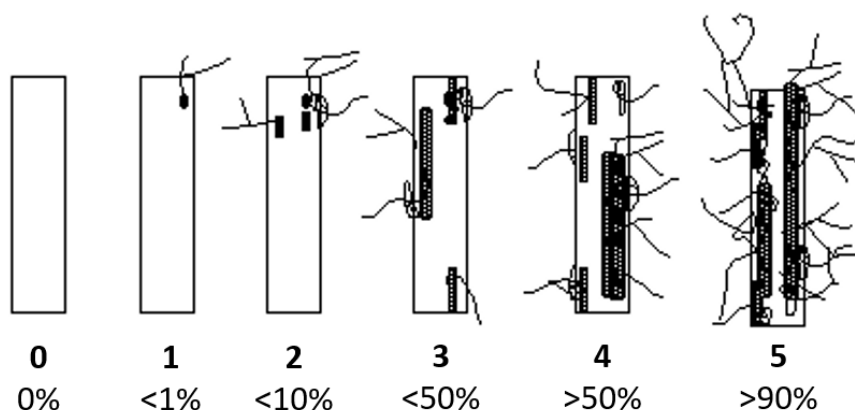
3.2.2. Ocena kolonizacji mikoryzowej korzeni roślin

3.2.2.1. Ocena kolonizacji mikoryzowej korzeni metodą Trouvelota

W celu oceny stopnia kolonizacji mikoryzowej korzenie barwiono wg. zmodyfikowanej metody Vierheilig i wsp. (1998). Korzenie zabezpieczone w 70% etanolu

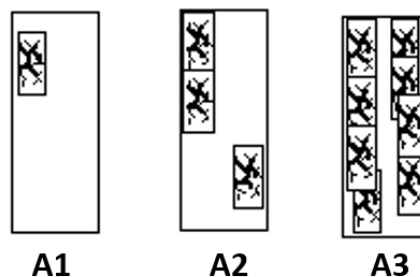
wypłukano pod bieżącą wodą i poddano 24-godzinnej depigmentacji w 10% KOH. Korzenie, które nie uległy depigmentacji po dodatkowym traktowaniu 10% KOH, wybielono w mieszaninie 20% NH_3 i 10% H_2O_2 (1:10, v/v). Następnie, korzenie wypłukano w wodzie i zakwaszono przy użyciu 3 – 4% HCl. Zakwaszone korzenie barwiono przez co najmniej 24 godziny w roztworze atramentu z octem (480 mL glicerolu, 425 mL wody, 50 mL atramentu Pelikan 4001[®], 45 mL kwasu octowego). Nadmiar barwnika został usunięty poprzez kilkukrotne 10-minutowe płukanie korzeni w 3% kwasie octowym. Wybarwione korzenie przechowywano w laktoglicerolu (glicerol, woda, kwas mlekowy; 1:1:1; v/v/v) w temp. pokojowej. Mikroskopową ocenę stopnia kolonizacji korzeni przez AMF przeprowadzono wg. zmodyfikowanej metody Trouvelota i wsp. (1986). Z wybarwionych 1 – 1,5 cm fragmentów korzeni sporządzono preparaty mikroskopowe. Ocenę stopnia mikoryzacji oraz liczby arbuskul i pęcherzyków dla każdego fragmentu korzenia, oparto na obserwacjach mikroskopowych wg. kryteriów przedstawionych na ryc. 12.

STOPNIE KOLONIZACJI MIKORYZOWEJ (0-5)



LICZBA ARBUSKUL (A1-A3)

Brak arbuskul: A0
 Pojedyncze arbuskule: A1
 Liczne arbuskule: A2
 Bardzo liczne arbuskule: A3



Ryc. 12. Schemat szacowania stopnia kolonizacji fragmentów korzeni przez AMF wg. metody Trouvelota i wsp. (1986).

Dla każdej próby, analizie poddano 100 fragmentów korzeni. Parametry kolonizacji mikoryzowej takie jak: częstość występowania mikoryzy w systemie korzeniowym (F%), intensywność kolonizacji mikoryzowej systemu korzeniowego (M%), intensywność kolonizacji mikoryzowej fragmentów korzeni (m%), liczba arbuskul w mikoryzowych fragmentach korzeni (a%) i liczba arbuskul w systemie korzeniowym (A%), obliczono wg. poniższych wzorów z wykorzystaniem programu Mycocalc (<https://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>).

$$F\% = \frac{\text{liczba fragmentów mikoryzowych}}{N} * 100$$

$$M\% = \frac{95n5+70n4+30n3+5n2+n1}{N}$$

$$m\% = \frac{M\% * N}{\text{liczba fragmentów mikoryzowych}}$$

$$a\% = \frac{100mA3+50mA2+10mA1}{100}$$

$$A\% = \frac{a\%}{(M\%/100)}$$

gdzie: N – całkowita liczba fragmentów

$n5, n4, n3, n2, n1$ – liczba fragmentów ocenionych jako 5, 4, 3, 2, 1

$mA3, mA2, mA1$ – procent fragmentów mikoryzowych ocenionych odpowiednio jako

$$A3, A2, A1, \text{ np. } A3 = \frac{95n5A3+70n4A3+30n3A3+5n2A3+n1A3}{\text{liczba fragmentów mikoryzowych}} * \frac{100}{m\%}$$

3.2.2.2. Ocena kolonizacji mikoryzowej korzeni metodą qPCR

Do oceny kolonizacji mikoryzowej korzeni zastosowano ilościową reakcję łańcuchową polimerazy (qPCR – ang. quantitative polymerase chain reaction) ze starterami AMV4.5NF (5'-AAGCTCGTAGTTGAATTTTCG-3') i AMDGR (5'-CCCAACTATCCCTATTAATCAT-3'), specyficznymi wobec fragmentu genu SSU rDNA o długości ~300 pz (Sato i wsp., 2005). Reakcje PCR przeprowadzono z zastosowaniem zestawu SYBR Green qPCR kit (Roche, Bazylea, Szwajcaria) w objętości 10 μ L mieszaniny reakcyjnej zawierającej: 1 \times FastStart Essential DNA Green Master Mix, 0,5 mM starterów AMV4.5NF i AMDGR i 1,5 ng matrycowego DNA wyizolowanego z korzeni lub 1 μ L odpowiedniego rozcieńczenia standardu, w dwóch powtórzeniach technicznych. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze LightCycler® 96 Instrument (Roche, Bazylea,

Szwajcaria) w następujących warunkach: wstępna denaturacja w 95°C (5 min); 40 cykli obejmujących: denaturację w 95°C (10 s), przyłączanie starterów w 55°C (30 s), elongację w 72°C (30 s) i usuwanie dimerów starterów oraz odbiór sygnału w 80°C (10 s). Liczbę kopii genu AMF SSU rDNA w każdej próbce obliczono w programie LightCycler® 96 Application Software (Roche) na podstawie krzywej kalibracyjnej sporządzonej z serii rozcieńczeń standardu o określonym stężeniu, który zawierał wektor plazmidowy z fragmentem genu SSU rDNA pochodzącym od *R. irregularis* DAOM 197198 jako insertem. W celu sporządzenia standardu, powyższy fragment genu uzyskano w wyniku reakcji PCR ze starterami AMV4.5NF i AMDGR, na matrycy DNA wyizolowanego ze spor *R. irregularis* DAOM 197198. Produkt PCR wklonowano do wektora plazmidowego pGEM®-T Easy (Promega, Madison, Wisconsin, Stany Zjednoczone), po czym wprowadzono do kompetentnych komórek *Escherichia coli* JM109 (Promega) zgodnie z instrukcją producenta. Komórki wysiano na bulion lizogenny (LB – ang. lysogeny broth) z dodatkiem izopropyl-β-D-tiogalaktopiranozydu (IPTG; 0,5 mM), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopiranozydu (X-Gal; 0,1 mg mL⁻¹) i ampicyliny (0,1 mg mL⁻¹). Hodowle inkubowano przez noc w temp. 37°C, po czym przeprowadzono selekcję na białe kolonie zawierające plazmid z insertem i niebieskie kolonie zawierające plazmid bez insertu (ang. blue-white screening) (Sambrook i wsp., 1989). Biomasa bakteryjną z białych kolonii namnożono w pożywce LB z ampicyliną (0,1 mg mL⁻¹), inkubując z wytrząsaniem (120 rpm) w 37°C przez noc. Plazmidy wyizolowano z biomasy bakteryjnej z zastosowaniem zestawu GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Stany Zjednoczone) zgodnie z instrukcją producenta.

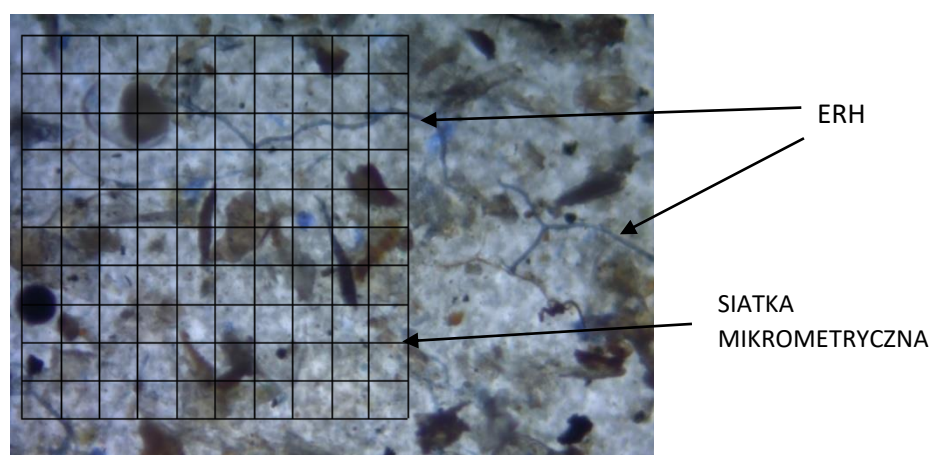
3.2.3. Szacowanie liczby spor AMF w glebie

Izolację spor AMF przeprowadzono metodą przesiewania i dekantacji opracowaną przez Gerdemanna i Nicolsona (1963). 20 g gleby zawieszono w 1 dm³ wody i mieszano intensywnie przez 10 min na mieszadle magnetycznym. Po upływie 10 s od zakończenia mieszania i opadnięciu ziaren piasku, roztwór glebowy został przelany przez zestaw sit o średnicy oczek 2,00 mm i 0,04 mm. Mieszanie (2 min) i izolację spor powtarzano 3 – 4 krotnie, do momentu uzyskania klarownego roztworu. Frakcja osadzona na sicie o średnicy oczek 2,00 mm, zawierająca fragmenty korzeni, piasek i duże cząstki organiczne, została odrzucona. Materiał osadzony na sicie o średnicy oczek 0,04 mm, zawierający frakcję

pylistą, drobne cząstki organiczne i spory AMF, został przepłukany pod bieżącą wodą i oczyszczony metodą wirowania w sacharozie Daniela i Skipper (1982). Materiał wypłukany z sita zwirowano w wodzie ($2000 \times g$, 5 min), supernatant odrzucono, po czym pelet zawieszono w 50% roztworze sacharozy i ponownie zwirowano ($2000 \times g$, 1 min). Supernatant zawierający oczyszczone spory niezwłocznie przelano przez sito o średnicy oczek 0,04 mm i przepłukano pod bieżącą wodą. Spory wymyto z sita, zawieszono w niewielkiej ilości wody i zliczono pod mikroskopem stereoskopowym.

3.2.4. Pomiar długości mycelium zewnątrzkorzeniowego AMF w glebie

Ekstrakcję ERM z gleby przeprowadzono wg. zmodyfikowanej metody Brundretta i wsp. (1994). 10 g gleby zawieszono w mieszaninie 370 mL wody i 30 mL roztworu tzw. „calgonu” ($35,7 \text{ g L}^{-1} (\text{NaPO}_3)_6$). Zawiesinę pozostawiono na 1,5 h w temp. pokojowej, po czym mieszano na mieszadle magnetycznym przez 10 min. 15 mL wymieszanego roztworu glebowego przefiltrowano przez zestaw sit o średnicy oczek 2 mm i 0,04 mm. Frakcję pobraną z sita o średnicy oczek 0,04 mm zawieszono w 30 mL wody z dodatkiem 2 mL „calgonu” i pozostawiono na 30 s. Następnie, 10 mL zawiesiny przefiltrowano przez filtr nitrocelulozowy o średnicy oczek $0,45 \mu\text{m}$ i barwiono 0,05% roztworem błękitu trypanu w laktoglicerolu przez 1,5 h. Filtry z wybarwionym ERM umieszczono na szkiełkach przedmiotowych za pomocą laktoglicerolu. Długość ERM oszacowano pod mikroskopem w 150-krotnym powiększeniu, zliczając punkty przecięcia strzępki z wertykalnymi i horyzontalnymi liniami siatki 10×10 , umieszczonej na mikrometrze okularowym (ang. grid line intersect method) (Newman, 1966; Tennant, 1975) (Ryc. 13)



Ryc. 13. Obraz mikroskopowy ERH na powierzchni filtra, wraz z siatką mikrometryczną (pow. 150 x, zdjęcie własne).

Dla każdej próby analizie poddano 50 pól siatki na filtrze nitrocelulozowym, obliczając długość ERM wg. poniższego wzoru.

$$\text{Długość ERM [mm]} = \frac{\left(\frac{11}{14} * c * a\right) * (3,142 * r^2)}{\frac{s}{100} * g^2}$$

gdzie: c – liczba przecięć

a – rozmiar jednego pola filtra pod pow. 150x = 0,08 mm

r – promień filtra nitrocelulozowego = 20 mm

s – liczba analizowanych pól siatki mikrometrycznej = 5000

g – długość jednego boku siatki mikrometrycznej pod pow. 150x = 0,08 mm

Ostateczny wynik podano w m ERM g s.m. gleby⁻¹.

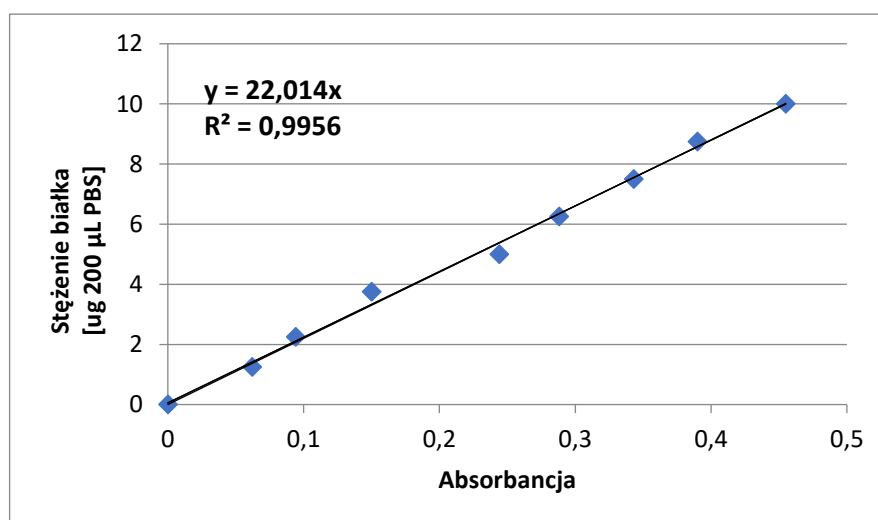
3.2.5. Ocena ilości białek glebowych spokrewnionych z glomalinami

Ekstrakcję dwóch frakcji białek glebowych spokrewnionych z glomalinami, łatwo ekstrahowalnej (EE-GRSP – ang. easily extractable glomalin-related soil proteins) i całkowitej (T-GRSP – ang. total glomalin-related soil proteins), przeprowadzono wg. metody opracowanej przez Wrighta i Upadhyaya (1998). Frakcję EE-GRSP uzyskano poprzez autoklawowanie zawiesiny 1 g gleby w 8 mL 20mM cytrynianu sodu przez 30 min. Po zwirowaniu próby (4500 × g, 15 min), supernatant pobrano do dalszych oznaczeń. Frakcję T-GRSP uzyskano poprzez autoklawowanie zawiesiny 1 g gleby w 8 mL 50 mM cytrynianu sodu, w czterech 60 min cyklach. Po każdym cyklu próbkę wirowano, pobierano supernatant i pelet zawieszano w świeżej porcji cytrynianu sodu. Ekstrakcję przeprowadzono w trzech powtórzeniach na próbkę. Zawartość białka w ekstraktach oznaczono metodą Bradford (Bradford, 1976; Wright i wsp., 1996), stosując roztwory albuminy surowicy bydlęcej (BSA – ang. bovine serum albumin) w stężeniach 0 – 25 µg mL⁻¹ jako standardy. Do dołków płytki 96-dołkowej wprowadzono po 200 µL odpowiedniego standardu lub roztworów ekstraktów glebowych rozcieńczonych w buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (PBS – ang. phosphate buffered saline). Zasadę sporządzania roztworów ekstraktów opisano w tabeli 1. Do każdego dołka dodano 50 µL odczynnika barwiącego białka (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate), wymieszano i po 5 min odczytano absorbancję przy długości fali 595 nm za pomocą czytnika Biolog MicroStation (Biolog, Hayward, Kalifornia, Stany Zjednoczone). Stężenie GRSP (mg GRSP kg s.m. gleby⁻¹) w próbkach obliczono z równania krzywej kalibracyjnej

sporządzonej z szeregu roztworów BSA (Ryc. 14). Stężenie T-GRSP w danej próbce stanowiło sumę stężeń GRSP z czterech cykli ekstrakcyjnych.

Tabela 1. Schemat poboru objętości ekstraktu glebowego do sporządzenia roztworu w buforze PBS (objętość całkowita 200 μL).

Barwa ekstraktu	Ilość ekstraktu na jeden pomiar (dolek w płytce)
Słomkowa	> 50 μL
słomkowo-brązowa	25-50 μL
Jasnobrązowa	10-25 μL
Ciemnobrązowa	5-10 μL
brązowo-czarna	1-5 μL



Ryc. 14. Krzywa kalibracyjna do obliczania stężenia GRSP.

3.2.6. Analiza profili fosfolipidowych i neutralnych kwasów tłuszczowych w glebie

Ekstrakcję fosfolipidowych (PLFAs – ang. phospholipid fatty acids) i neutralnych (NLFAs – ang. neutral fatty acids) kwasów tłuszczowych z gleby, przeprowadzono wg. zmodyfikowanej metody Frostegarda i wsp. (1993). Lipidy ekstrahowano z 2 g gleby poprzez wytrząsanie (220 rpm, 18 h) w roztworze Blight-and-Dyer (chloroform, metanol, bufor cytrynianowy 0,15 M, pH= 4; 1:2:0,8; v/v/v). Próby wirowano (1500 $\times g$, 10 min), po czym pelet odrzucono, a supernatant przeniesiono do nowej probówki. Do ekstraktu dodano 3,2 mL chloroformu i 3,2 mL buforu cytrynianowego, worteksowano przez 1 min i pozostawiono na noc w 4°C w celu rozdziału faz na wodną i organiczną. Zebraną fazę organiczną odparowano w strumieniu azotu w łaźni wodnej o temp. 40°C. Wysuszony

ekstrakt lipidowy rozpuszczono w 100 μ L chloroformu, worteksując przez 30 s i nałożono na kolumnę krzemionkową (Supelclean™ LC-Si SPE Tube, 3 mL, Supelco) przemytą wcześniej 5 mL chloroformu. Kolumny podłączono do kolektora próżniowego i kolejne frakcje lipidów: lipidy neutralne, glikolipidy i fosfolipidy, wymywano odpowiednio, 6 mL chloroformu, 12 mL acetonu i 6 mL metanolu. Frakcję glikolipidów odrzucono, natomiast frakcje lipidów neutralnych i fosfolipidów wysuszono w strumieniu azotu w łaźni wodnej o temp. 30°C. Przed transestryfikacją kwasów tłuszczowych do estrów metylowych, do próbek dodano 10 μ L standardu estrów metylowych 19:0 o stężeniu 0,2 mg mL⁻¹. Próbkę rozpuszczono w 1 mL mieszaniny metanolu z toluenem (1:1, v/v), dodano 1 mL 0,2 M roztworu KOH w metanolu, po czym inkubowano w łaźni wodnej w temp. 37°C przez 15 min. Dodano 2 mL mieszaniny heksanu z chloroformem (4:1, v/v), 0,3 mL 1 M kwasu octowego, aby zatrzymać reakcję i 2 mL wody Millipore przemytej chloroformem. Próbkę worteksowano przez 1 min i wirowano (2000 \times g, 5 min), po czym przeniesiono fazę organiczną do nowej probówki i wysuszono ją w strumieniu azotu w temp. pokojowej. Po rozpuszczeniu prób w 100 μ L heksanu, estry metylowe kwasów tłuszczowych rozdzielono metodą chromatografii gazowej na chromatografie 7820A (Agilent Technologies) wyposażonym w kolumnę HP-Ultra 2 (średnica wewnętrzna: 0,20 mm, długość: 25 m, pokrycie: 5% fenylo-metylosilikon, grubość filmu: 0,33 μ m) i detektor jonizacji płomieniowej, z zastosowaniem wodoru jako gazu nośnego. Analizę jakościową i ilościową profili kwasów tłuszczowych przeprowadzono za pomocą systemu identyfikacji mikroorganizmów MIDI (metoda Sherlock TSBA40, biblioteka TSBA40; MIDI Inc., Newark, Delaware, Stany Zjednoczone). Na podstawie zawartości kwasów tłuszczowych, wyrażonej w nM g s.m. gleby⁻¹, oszacowano biomasę mikroorganizmów glebowych, z wyszczególnieniem bakterii Gram-ujemnych (16:1 ω 7c, cy17:0, 18:1 ω 7c, cy19:0 PLFAs), bakterii Gram-dodatnich (i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0 PLFAs), promieniowców (10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0 PLFAs) (Moore-Kucera i Dick, 2008), grzybów saprofitycznych (18:2 ω 6.9c, 18:1 ω 9c PLFAs) (Frostegård i wsp., 2011) i AMF (16:1 ω 5c NLFAs) (Olsson, 1999).

3.2.7. Analiza bioróżnorodności społeczności AMF z zastosowaniem elektroforezy w gradiencie czynnika denaturującego (DGGE)

3.2.7.1. Izolacja DNA z gleby i z korzeni

Izolację DNA z gleby przeprowadzono za pomocą zestawu PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (Mo Bio, Carlsbad, Kalifornia, Stany Zjednoczone) zgodnie z instrukcją producenta. DNA wyizolowano z 0,25 g gleby w dwóch powtórzeniach i obie próbki zmieszano przed elucją DNA. Izolację DNA z korzeni przeprowadzono z zastosowaniem zestawu PowerPlant[®] DNA Isolation Kit (Mo Bio). Jakość i stężenie DNA w próbkach sprawdzono na spektrofotometrze UV-Vis NanoDrop[™] 2000 (Thermo Fischer Scientific) oraz poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym. Próbki, do czasu dalszych analiz, przechowywano w temp. -80°C.

3.2.7.2. Warunki reakcji PCR

Amplifikacji poddano fragment genu SSU rDNA specyficzny dla AMF, stosując trzystopniową zagnieżdżoną reakcję PCR. Reakcje przeprowadzano w termocyklerze T100[™] Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Stany Zjednoczone), z zastosowaniem polimerazy DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z instrukcją producenta. Pierwszą reakcję z uniwersalnymi starterami eukariotycznymi NS1/NS4, przeprowadzono w następujących warunkach: 95°C przez 10 min; 34 cykle: 95°C przez 30 s, 55°C przez 45 s, 72°C przez 60 s; 72°C przez 5 min. Do reakcji zastosowano DNA matrycowe, wyizolowane z korzeni lub z gleby, o stężeniu 10 ng μL^{-1} . Produkt reakcji PCR ze starterami NS1/NS4 rozcieńczono 50-krotnie i użyto jako matryca do drugiej reakcji PCR ze starterami AML1/AML2 w celu amplifikacji fragmentu genu SSU rDNA specyficznego dla AMF w następujących warunkach: 95°C przez 3 min; 34 cykle: 95°C przez 30 s, 50°C przez 45 s, 72°C przez 60 s; 72°C przez 5 min. Produkt reakcji PCR ze starterami AML1/AML2 rozcieńczono 50-krotnie i zastosowano jako matryca do reakcji PCR ze starterami NS31-GC/Glo1 w celu amplifikacji fragmentu genu SSU rDNA specyficznego dla AMF, z dołączoną kłamrą GC. Reakcję przeprowadzono w następujących warunkach: 95°C przez 2 min; 34 cykle: 95°C przez 45 s, 54°C przez 45 s, 72°C przez 45 s; 72°C przez 5 min. Szczegółowe dane dotyczące zastosowanych starterów przedstawiono w tabeli 2.

Jakość i wielkość produktów po każdej reakcji sprawdzono poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym.

Tabela 2. Startery zastosowane do amplifikacji produktów analizowanych metodą DGGE (ang. denaturing gradient gel electrophoresis).

Starter	Sekwencja nukleotydowa 5' → 3'	Długość produktu	Referencje
NS1	GTA GTC ATA TGC TTG TCT C	1100 pz	White i wsp., 1990
NS4	CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG		
AML1	ATC AAC TTT CGA TGG TAG GAT AGA	795 pz	Lee i wsp., 2008
AML2	GAA CCC AAA CAC TTT GGT TTC C		
NS31-GC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG TTG GAG GGC AAG TCT GGT GCC	300 pz	Liang i wsp., 2008
Glo1	GCC TGC TTT AAA CAC TCTA		

3.2.7.3. Elektroforeza w gradiencie czynnika denaturującego

DGGE przeprowadzono z wykorzystaniem systemu D-Code Universal Mutation Detection System (Bio-Rad). 20 µL produktu reakcji PCR ze starterami NS31-GC/Glo1 nałożono na 6% żel poliakrylamidowy (37.5:1 akrylamid:bisakrylamid) z utworzonym 30% – 50% liniowym gradientem czynnika denaturującego. Gradient został utworzony za pomocą urządzenia do formowania gradientu poprzez zmieszanie roztworów poliakrylamidu zawierających 0% i 100% czynnika denaturującego (7 M mocznik, 40% formamid). Elektroforezę prowadzono w 60°C przez 15 h przy napięciu 70 V. Następnie, żel poliakrylamidowy barwiono SYBR Gold (Invitrogen, Carlsbad, Kalifornia, Stany Zjednoczone) zgodnie z instrukcją producenta i sfotografowano z zastosowaniem systemu Gel DocTM XR+ System z transiluminatorem UV (Bio-Rad).

3.2.7.4. Analiza bioróżnorodności społeczności AMF na podstawie profili DGGE

Detekcję prążków w żelu poliakrylamidowym i obliczenie ich intensywności względnej przeprowadzono w programie Image LabTM (Bio-Rad). Otrzymane wartości stanowiły dane do obliczenia wskaźników bogactwa gatunkowego (R'), bioróżnorodności Shannona (H') i równomierności (J') wg. poniższych wzorów:

$R' = \text{liczba prążków}$

$$H' = -\sum_{i=1}^{R'} p_i \ln p_i$$

gdzie: p_i – stosunek względnej intensywności danego prążka do sumy intensywności wszystkich prążków w próbce

$$J' = \frac{H'}{\ln R'}$$

Macierz odległości pomiędzy badanymi społecznościami AMF obliczono w programie Mothur 1.39 (Schloss i wsp., 2009) za pomocą współczynnika podobieństwa Jaccarda, biorąc pod uwagę obecność lub brak prążka w danym profilu DGGE. Przykładowo, obliczając podobieństwo między dwoma społecznościami AMF, współczynnik Jaccarda przybrałby następującą postać:

$$J(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A| + |B| - |A \cap B|}$$

gdzie: $|A \cap B|$ - liczba jednakowych prążków występujących w obu społecznościach A i B,

$|A|$ – liczba prążków w społeczności A,

$|B|$ – liczba prążków w społeczności B.

Na podstawie macierzy odległości wykonano analizę skupień metodą średnich połączeń (UPGMA – ang. unweighted pair-group method using arithmetic averages). Dendrogram sporządzono w programie FigTree 1.4 (Rambaut, 2009).

3.2.7.5. Identyfikacja dominujących gatunków AMF

Dominujące gatunki AMF identyfikowano na podstawie sekwencji fragmentu genu SSU rDNA. W tym celu, z żelu wycięto prążki o największej względnej intensywności. Wycięte prążki inkubowano przez noc w 30 μ L wody w temp. 4°C w celu elucji DNA, które użyto do reakcji PCR ze starterami NS31/Glo1 bez klamry GC w warunkach opisanych w rozdziale 3.2.5.2. Produkty reakcji oczyszczono za pomocą zestawu Clean-Up Kit (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska), po czym czystość i stężenie DNA sprawdzono poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym i na spektrofotometrze UV-Vis NanoDrop™ 2000 (Thermo Fischer Scientific). Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera zlecono firmie Genomed S.A. (Warszawa, Polska). Uzyskane sekwencje sprawdzono pod kątem jakości i edytowano w programach Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane,

Queensland, Australia) i Mega 6.06 (Tamura i wsp., 2013). Sekwencje zidentyfikowane w oparciu o bazę danych sekwencji nukleotydowych NCBI (ang. National Centre for Biotechnology Information) za pomocą algorytmu nucleotide BLAST (ang. basic local alignment search tool), jako nie należące do podgromady *Glomeromycotina* oraz sekwencje chimeryczne, wykluczono z dalszej analizy. Sekwencje należące do *Glomeromycotina* zgrupowano w molekularne operacyjne jednostki taksonomiczne (MOTUs – ang. molecular operational taxonomic units) w programie Mothur 1.39, zakładając próg podobieństwa 97%. Sekwencje reprezentujące poszczególne MOTUs oraz osiemnaście sekwencji referencyjnych, dostępnych w bazie NCBI, uporządkowano i dopasowano stosując narzędzie MAFFT dostępne na platformie XSDE 7.305 (Katoh i wsp., 2005) przez portal internetowy CIPRES Science Gateway (Miller i wsp., 2010). Globalne uporządkowanie sekwencji przeprowadzono metodą G-INS-i, wybierając macierz punktowania 20PAM/k=2. Drzewo filogenetyczne skonstruowano w oparciu o wnioskowanie bayesowskie w programie MrBayes 3.2 (Ronquist i wsp., 2012), stosując model substytucji nukleotydów GTR+G (ang. general time-reversible + gamma distribution). Wygenerowano cztery łańcuchy Markowa-Monte Carlo przeszukując milion pokoleń z próbkowaniem 1000 drzew. Konstrukcję drzewa oparto na drzewie referencyjnym zbudowanym z osiemnastu sekwencji SSU rDNA należących do AMF o długości ok. 1120 pz, wg. tych samych, opisanych wyżej parametrów. Obróbkę graficzną drzewa przeprowadzono w programie Mega 6.06. Uzyskane sekwencje zdeponowano w bazie danych GenBank NCBI pod numerami dostępu MK351205–MK351220.

3.2.8. Analiza bioróżnorodności społeczności AMF z zastosowaniem sekwencjonowania nowej generacji

3.2.8.1. Projektowanie starterów i referencyjnej bazy danych sekwencji genu LSU rDNA należących do *Glomeromycotina*

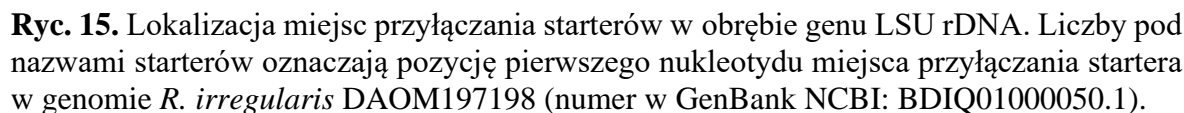
Startery amplifikujące fragment D2 genu LSU rDNA zaprojektowano w oparciu o uporządkowanie i dopasowanie 595 sekwencji dostępnych w bazie danych GenBank, reprezentujących 140 gatunków przynależących do podgromady *Glomeromycotina* (Tabela 3; Ryc. 15; Ryc. 16. A, B). Dopuszczono maksymalną różnicę dwóch niedopasowanych nukleotydów pomiędzy sekwencją startera i sekwencją docelową, z wyjątkiem pięciu ostatnich nukleotydów na końcu 3'. Właściwości starterów, takie jak zawartość par GC,

temperatura topnienia i ryzyko tworzenia struktur drugorzędowych oraz dimerów, sprawdzono w programie Primer3Plus (Untergasser i wsp., 2007). Analiza w programie Primer-Blast wykazała, że zaprojektowane startery FULF i FULR są uniwersalne dla całego królestwa grzybów, jednakże umożliwiają odróżnienie amplikonów należących do *Glomeromycotina* od innych taksonów na podstawie wyraźnych różnic w ich wielkości, po rozdziale produktów PCR w żelu agarozowym. Zakres wielkości potencjalnych amplikonów uzyskanych dla *Glomeromycotina* ze starterami nazwanymi FULF i FULR wynosił od 356 pz (*Racocetra versubiae*) do 425 pz (*Dominika iranica*). Wielkość potencjalnych amplikonów przynależnych do *Basidiomycota* i *Ascomycota* była o wiele niższa i nie przekraczała 320 pz. Amplikony o podobnej wielkości, lecz nie należące do *Glomeromycotina*, zidentyfikowano wśród gromad *Mucoromycota*, *Blastocladiomycota* i *Chytridiomycota*. Stwierdzono, że obecność niewielkiej frakcji niespecyficznych amplikonów w puli amplikonów genu LSU rDNA przynależnych do *Glomeromycotina* nie wpłynie istotnie na jakość sekwencjonowania. Startery FULFN1ngs i FULFN2ngs oraz FULRNngs zaprojektowano w celu doczepienia do sekwencji genu LSU rDNA sekwencji adapterów wymaganych do sekwencjonowania na platformie MiSeq (Illumina, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone) (Tabela 3; Ryc. 15).

Tabela 3. Sekwencje starterów zaprojektowanych w celu sporządzenia bibliotek metagenomicznych fragmentów genu LSU rDNA AMF.

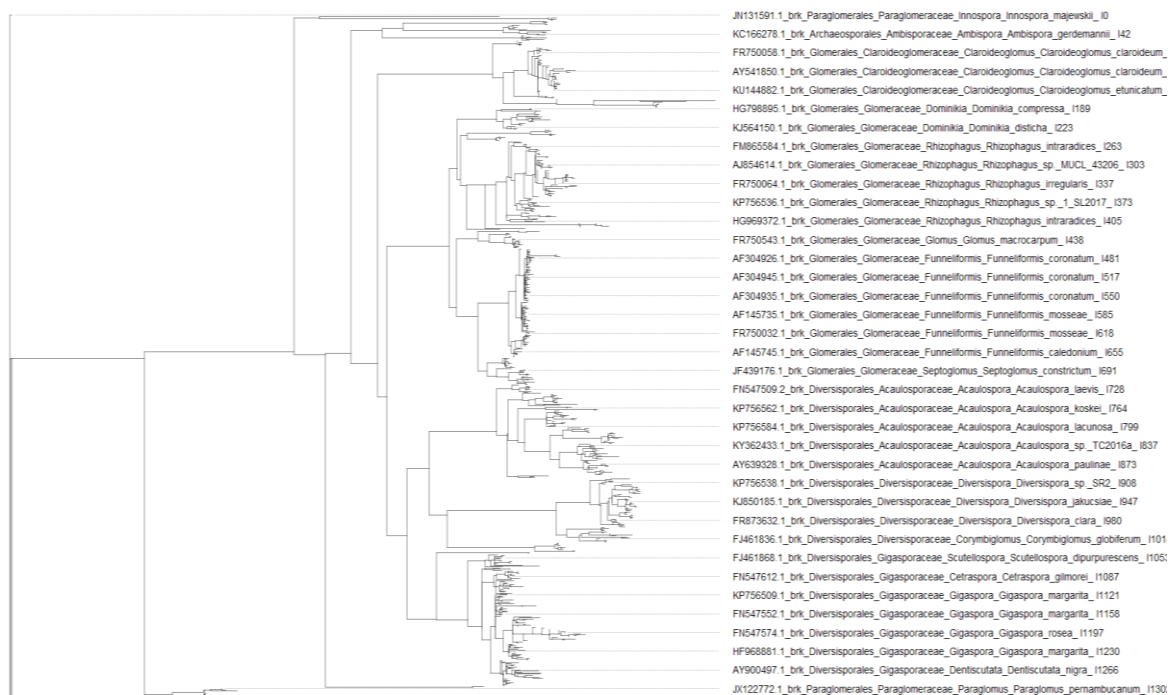
Nazwa startera	Sekwencje starterów i adapterów (5' – 3')	Wielkość produktów
FULF (forward)	GTGAAATTGTTGAAAGGGAAACG	193-425
FULR (reverse)	CCTTGGTCCGTGTTTCAAGAC	
FULFN1ngs (forward)	(TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG) AGGGAAACGATTGAAGCCAGTC	423-492
FULFN2ngs (forward)	(TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG) GAAAGGGAAACGATTGAAGTCAGT	
FULRNngs (reverse)	(GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG) CGTGTTTCAAGACGGGTCGT	

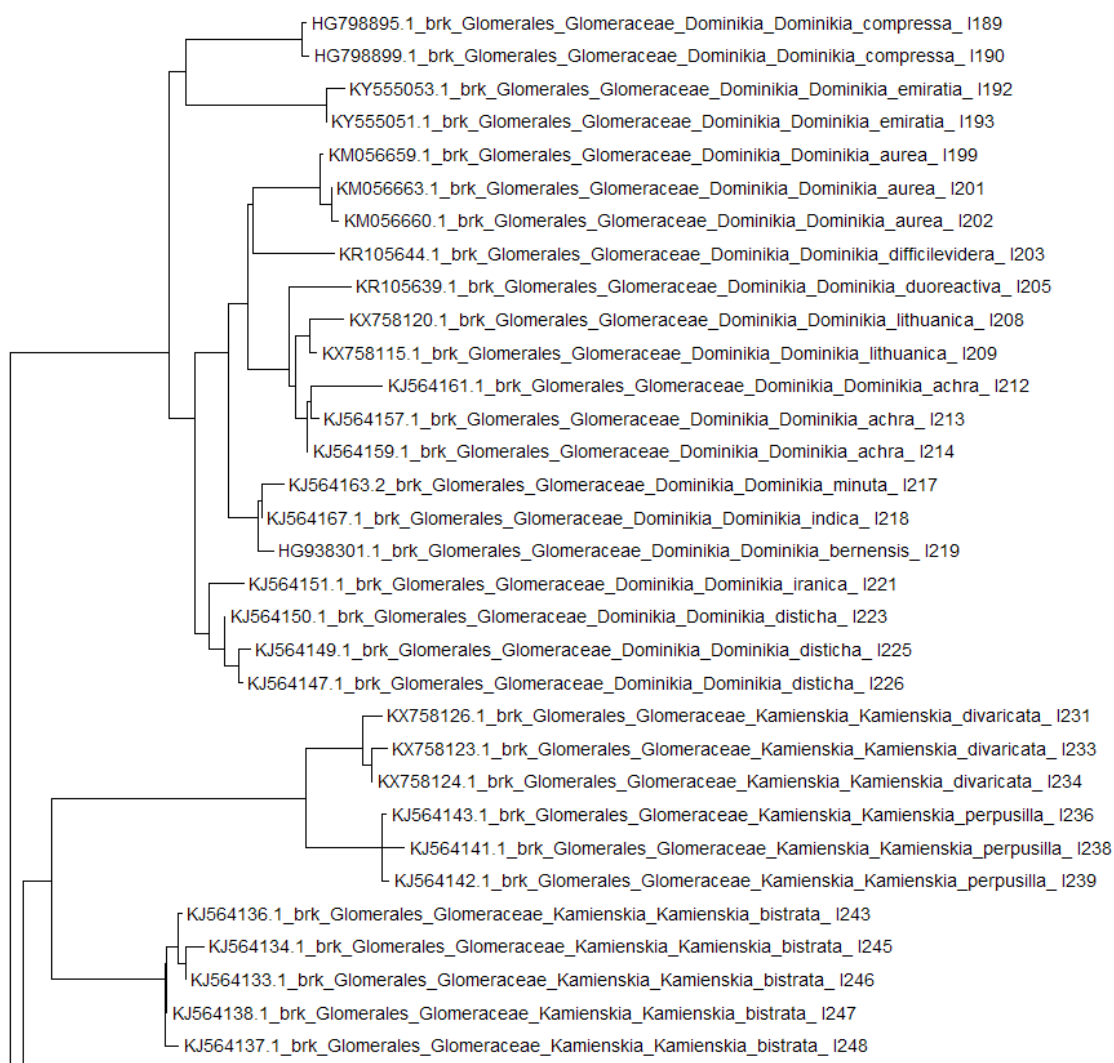
* sekwencje adapterów zapisane kursywą zamieszczono w nawiasach

[illegible][illegible]

Zbiór 595 dopasowanych sekwencji genu LSU rDNA przynależnych do *Glomeromycotina*, wraz z sekwencją genu LSU rDNA *Tremiscus helvelloides* stanowiącą grupę zewnętrzną, przycięto do miejsca przyłączania starterów FULFN1ngs/FULFN2ngs i FULRNngs, a następnie ponownie dopasowano w programie MAFFT stosując ustawienia domyślne. Na podstawie dopasowanych sekwencji, metodą największej wiarygodności (ML – ang. maximum likelihood) w programie RAxML (Stamatakis, 2014) wygenerowano drzewo filogenetyczne z wartością bootstrap dla 1000 powtórzeń, stosując model substytucji nukleotydów GTR+G. Analizy przeprowadzono na platformie XSDE 7.305 przez portal internetowy CIPRES Science Gateway. Uzyskane drzewo potwierdziło właściwą pozycję taksonomiczną sekwencji z rozdzielczością na poziomie gatunku (Ryc. 17. A, B). Na podstawie utworzonego zbioru sekwencji D2 LSU rDNA przynależnych do *Glomeromycotina*, wraz z adnotacją ich przynależności taksonomicznej oraz pozycji filogenetycznej, sporządzono bazę danych do identyfikacji gatunkowej sekwencji uzyskanych poprzez sekwencjonowanie nowej generacji (NGS – ang. next generation sequencing).

A



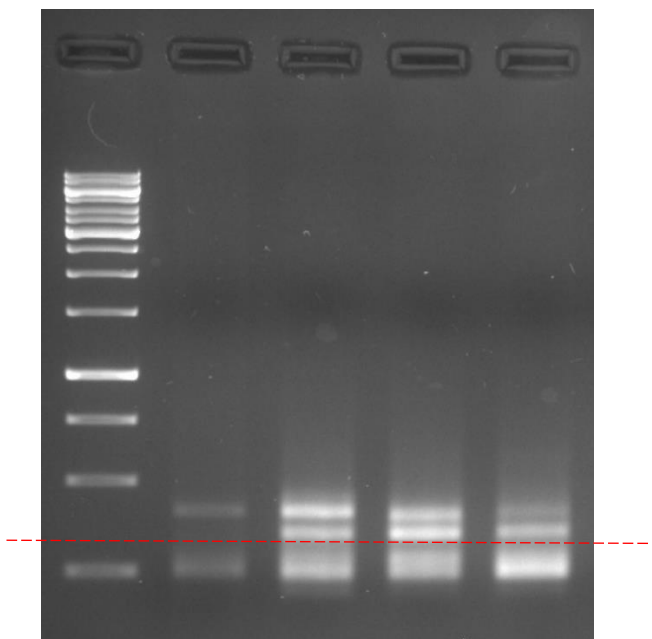
B

Ryc. 17. A. Drzewo filogenetyczne podgromady *Glomeromycotina* reprezentowane przez 595 sekwencji D2 LSU rDNA uzyskanych z zaprojektowanym zestawem starterów. **B.** Przykładowy fragment drzewa w przybliżeniu, wskazujący na pozycję filogenetyczną gatunków reprezentujących rodzaje *Dominikia* i *Kamienskia*.

3.2.8.2. Przygotowanie, analiza jakościowa oraz sekwencjonowanie bibliotek metagenomicznych

Biblioteki metagenomiczne sekwencji LSU rDNA należących do *Glomeromycotina* przygotowano w oparciu o przewodnik firmy Illumina „16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Guide” (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf). Matrycą do przygotowania bibliotek było DNA wyizolowane z korzeni oraz z gleby wg.

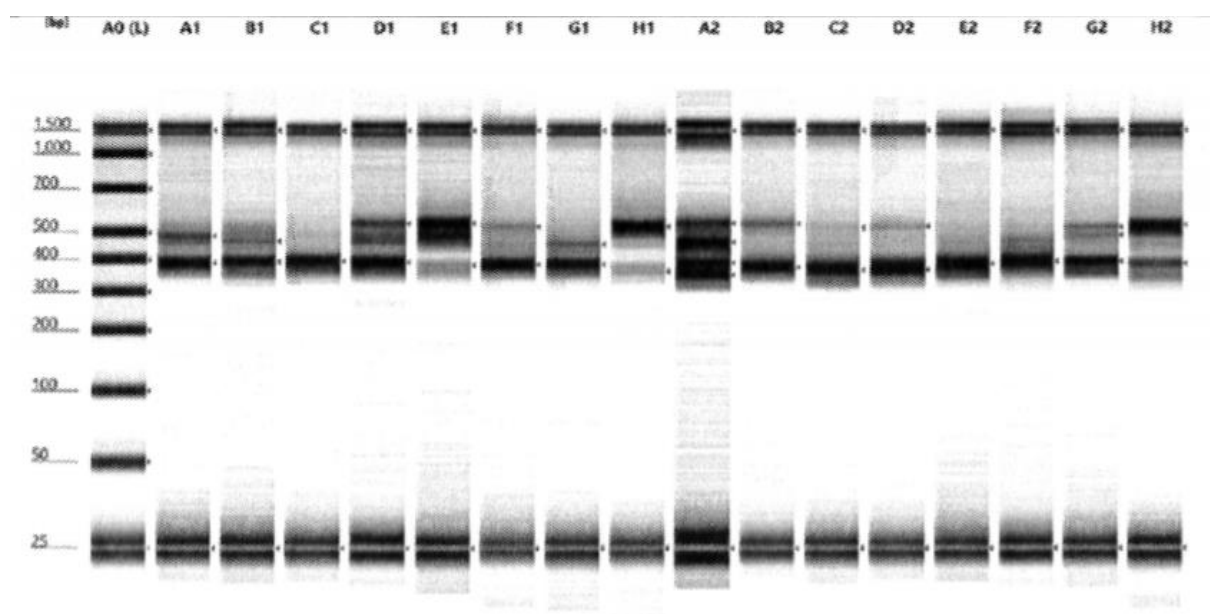
protokołu opisanego w rozdziale 3.2.5.1. Fragmenty sekwencji genu LSU rDNA amplifikowano metodą zagnieżdżonej reakcji PCR ze starterami FULF i FULLR oraz FULFN1ngs/FULFN2ngs i FULLRNngs. Pierwszą reakcję ze starterami FULF i FULLR przeprowadzono w objętości 25 μL z zastosowaniem polimerazy DreamTaq zgodnie z instrukcją producenta, z dodatkiem 0,25 μL BSA (20 mg mL^{-1}) i 0,8 μL MgCl_2 (25 mM). Reakcje przeprowadzono w termocyklerze T100TM (Bio-Rad) w następujących warunkach: 15 min w 95°C; 34 cykle: 20 s w 95°C, 30 s w 56°C, 45 s w 72°C; 5 min w 72°C. Produkty reakcji zostały rozdzielone poprzez elektroforezę w 3% żelu agarozowym (Basica LE GQT Prona Agarose, Resolva GQT Prona Agarose; 1:1; w/w). Produkty specyficzne dla *Glomeromycotina* oczyszczono poprzez wycięcie z żelu prążków o odpowiedniej wielkości (Ryc. 18) z zastosowaniem zestawu Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).



Ryc. 18. Fragment żelu agarozowego zawierający produkty reakcji PCR ze starterami FULF i FULLR. Powyżej przerywanej czerwonej linii (>300 pz) znajdują się produkty zawierające sekwencje LSU rDNA należące do *Glomeromycotina*. Poniżej linii znajdują się produkty zawierające sekwencje należące do *Basidiomycota* i *Ascomycota*.

Oczyszczone produkty reakcji ze starterami FULF i FULLR rozcieńczono 10-krotnie, a następnie poddano amplifikacji ze starterami FULFN1ngs/FULFN2ngs i FULLRNngs w objętości reakcyjnej 25 μL , z zastosowaniem polimerazy DreamTaq w następujących warunkach: 1 min w 95°C; 34 cykle: 15 s w 95°C, 30 s w 56°C, 30 s w 72°C; 5 min w 72°C. Jakość produktów sprawdzono poprzez elektroforezę w 3% żelu agarozowym (Basica LE

GQT Prona Agarose, Resolva GQT Prona Agarose, 1:1, w/w) i oczyszczono je stosując zestaw Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. W kolejnej reakcji PCR do oczyszczonych produktów zawierających sekwencje adapterów doczepiono sekwencje indeksów stosując zestaw Nextera® XT Index Kit (Illumina). Reakcje ze starterami Index 1 (N7XX) oraz Index 2 (S5XX) przeprowadzono w objętości 50 µL z zastosowaniem polimerazy DreamTaq w następujących warunkach: 3 min w 95°C, 15 cykli: 30 s w 95°C, 30 s w 55°C, 30 s w 72°C; 5 min w 72°C. Produkty reakcji oczyszczono stosując zestaw Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System po czym poddano analizie jakościowej i ilościowej. Analizę jakościową przeprowadzono z zastosowaniem urządzenia Agilent 2200 TapeStation System i zestawu D1000 ScreenTape (Agilent Technologies), potwierdzając obecność 2–3 prążków na bibliotekę, o prawidłowej wielkości 370–500 pz (Ryc. 19).



Ryc. 19. Elektroforetyczna analiza bibliotek metagenomicznych na urządzeniu TapeStation 2200 wskazująca na obecność produktów PCR o wielkości od 370 pz do 500 pz. Do każdej z prób dodano markery wielkości 25 pz i 1500 pz.

Stężenie DNA w bibliotekach określono z użyciem fluorymetru Qubit™ i zestawu Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Wszystkie 96 bibliotek znormalizowano i sekwencjonowano w jednej puli na sekwenatorze MiSeq z założeniem uzyskania ~100 000 sparowanych odczytów o wielkości 250 pz na bibliotekę, stosując zestaw odczynników MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina). Opisaną analizę jakościowo-ilościową oraz sekwencjonowanie przeprowadzono w firmie Bionanopark Sp. z o.o (Łódź, Polska).

3.2.8.3. Analiza bioinformatyczna sekwencji i ich identyfikacja do gatunku z zastosowaniem algorytmu RAxML-EPA

Sekwencje przetworzono i przyporządkowano do MOTUs w programie Mothur 1.39. 116 013 58 sparowanych odczytów z 96 bibliotek poskładano w kontigi, po czym wykluczono z dalszej analizy sekwencje zawierające poniżej 300 pz, powyżej 500 pz, więcej niż cztery błędne nukleotydy oraz homopolimery składające się z więcej niż 22 nukleotydów. Spośród sekwencji prawidłowych wyłoniono sekwencje repetytywne zliczając ich powtarzalność, a następnie przyporządkowano je do skonstruowanej referencyjnej bazy danych sekwencji LSU rDNA *Glomeromycotina* stosując metodę Wanga (Wang i wsp., 2007) z minimalną wartością bootstrap 80%. Sekwencje potencjalnie sklasyfikowane jako *Glomeromycotina* dopasowano do matrycy referencyjnych sekwencji genu LSU rDNA metodą wyszukiwania hektamerów w parach sekwencji (ang. pairwise alignment) stosując algorytm Needlemana-Wunscha (Needleman i wsp., 1970). Dopasowane sekwencje filtrowano pod kątem wielkości, a następnie uporządkowano w klasy od najczęściej do najrzadziej występujących. Sekwencje przyporządkowano do tej samej klasy zakładając różnicę maksymalnie trzech nukleotydów (Huse i wsp., 2010). Z dalszej analizy wykluczono niezgrupowane sekwencje pojedyncze (278 885 sekwencji). Z 40 473 sekwencji reprezentujących każdą z klas wykluczono sekwencje chimeryczne stosując program Vsearch 2.10.4 (Rognes i wsp., 2016). Pozostałe 30 709 prawidłowych sekwencji reprezentatywnych zaklasyfikowano do MOTUs z zastosowaniem metody Vsearch DGC (ang. distance-based greedy clustering) (Westcott i Schloss, 2015), zakładając 97% podobieństwa pomiędzy sekwencjami. MOTUs dopasowano do referencyjnej bazy danych sekwencji LSU rDNA *Glomeromycotina* w programie MAFFT, po czym sekwencje przypisano do referencyjnego drzewa filogenetycznego sporządzonego metodą ML, stosując narzędzie RAxML-EPA (ang. randomized accelerated maximum likelihood-evolutionary placement algorithm), co umożliwiło klasyfikację MOTUs do gatunku (Berger i wsp., 2011).

3.2.8.4. Analiza bioróżnorodności społeczności AMF w oparciu o MOTUs

Analizę bioróżnorodności badanych społeczności AMF w oparciu o MOTUs, przeprowadzono w programie Mothur 1.39, jeżeli nie określono inaczej. Charakterystykę α -bioróżnorodności oparto na analizie krzywych rarefakcji, diagramów Venna oraz

następujących wskaźników: liczbie sekwencji, liczbie obserwowanych MOTUs, szacowanej liczbie MOTUs (estymator Chao1), indeksie pokrycia Gooda, indeksie H', odwróconym indeksie Simpsona ($1/S'$) oraz indeksie J'. Charakterystykę β -bioróżnorodności, obejmującą analizę skupień i nieparametryczne skalowanie wielowymiarowe (NMDS – ang. non-metric multidimensional scailing), oparto na macierzy podobieństwa obliczonej na podstawie indeksu Yue i Claytona (Yue i Clayton, 2005). MOTUs najistotniej definiujące rozmieszczenie poszczególnych społeczności AMF względem osi NMDS, zidentyfikowano na podstawie współczynnika korelacji rang Spearmana pomiędzy względną liczebnością każdego z MOTUs i wartościami osi. Dendrogramy oparte na analizie skupień wygenerowano w programie FigTree 1.4.3. Wykresy NMDS wykreślono w programie Past 3.14 (Hammer i wsp., 2001). Badane społeczności AMF pogrupowano w metaspołeczności, stosując model wielomianowy Dirichleta (DMM – ang. Dirichlet multinominal mixtures) (Holmes i wsp., 2012).

3.2.8.5. Analiza bioróżnorodności społeczności AMF w oparciu o pokrewieństwo filogenetyczne

Analizę bioróżnorodności AMF opartą na pokrewieństwie filogenetycznym przeprowadzono w programie Mothur 1.39, jeżeli nie określono inaczej. W celu skonstruowania drzewa filogenetycznego, obliczono macierz odległości pomiędzy parami dopasowanych sekwencji i przeprowadzono analizę skupień metodą RNJ (ang. relaxed neighbour joining) w programie Clearcut (Evans i wsp., 2006). α -bioróżnorodność określono za pomocą indeksu różnorodności filogenetycznej obliczonego na podstawie całkowitej długości reprezentatywnych gałęzi drzewa z 1000 losowych powtórzeń. Ilościową i jakościową filogenetyczną analizę β -bioróżnorodności oparto na odpowiednio, ważonym i nieważonym algorytmie UniFrac (Lozupone i wsp., 2006). Dendrogramy i analizy NMDS oparte na algorytmach UniFrac skonstruowano w programach FigTree 1.4.3 i Past 3.14.

3.2.9. Utworzenie kolekcji kultur AMF wyizolowanych ze środowiska

3.2.9.1. Izolacja AMF z próbek gleby okółokorzeniowej

W celu propagacji AMF w warunkach laboratoryjnych przygotowano serię doniczkowych kultur pułpkowych z mieszaną różnych gatunków gospodarzy roślinnych. Próbkę świeżej, przylegającej do korzeni gleby oraz fragmentów korzeni zmieszano ze sterylnym, przepłukany piaskiem rzecznym z dodatkiem keramzytu (sterylizowanym suchym powietrzem przez 3 h w 180°C) w stosunku 1:4 (v/v). Podłożem wypełniono doniczki o objętości 0,5 L i wysiano mieszaną nasion następujących gatunków roślin: *Plantago lanceolata*, *Trifolium pratense*, *Medicago sativa* i *Hordeum vulgare*. Kultury pułpkowe hodowano przez pół roku w pokoju hodowlanym (fotoperiod: 16 h dziennych, 8 h nocnych; temp. 20°C; natężenie światła 8000 lux; wilgotność powietrza 50 – 70%). Założono szesnaście kultur: po cztery kultury z gleby okółokorzeniowej *P. trivialis* i *Ph. australis* z terenu zanieczyszczonego i z terenu kontrolnego. Z dojrzałych kultur pobrano 50 g podłoża, z którego wyizolowano spory AMF wg. metody opisanej w rozdziale 3.2.3.1. W celu pobudzenia kiełkowania, młode, nieuszkodzone spory, inkubowano przez 2 dni w wodzie w temp. 4°C. Równocześnie, przygotowano kultury roślinne z *P. lanceolata* na podłożu stanowiącym mieszaną sterylnego piasku rzecznego z bentonitem w stosunku 1:10 (v/v). Kultury zaszczipione sporami AMF przygotowano w małych doniczkach o objętości 0,2 L. Ich dno zabezpieczono agrowłókniną, aby zapobiec przerastaniu korzeni poza doniczkę. Przed wysianiem do doniczek, nasiona *P. lanceolata* poddano powierzchniowej sterylizacji. Nasiona moczono przez 5 min w 70% roztworze alkoholu etylowego, płukano wodą 3 × 5 min, moczono w 50% roztworze ACE przez 10 minut, po czym ponownie płukano wodą 3 × 10 min. Tydzień po wykiełkowaniu siewek kultury zaszczipiono pojedynczymi sporami AMF, wyizolowanymi z kultur pułpkowych, umieszczając sporę w pobliżu wierzchołka korzenia siewki. Kultury hodowano przez 6 miesięcy w takich samych warunkach jak opisano powyżej. Następnie, z kultur pobrano po ok. 10 g podłoża do izolacji spor metodą przesiewania i dekantacji. Kultury, w których rozwinęły się spory, pozostawiano na kilka dni w temperaturze pokojowej do wysuszenia, po czym podłoża ze sporami przechowywano w 4°C. Przed upływem miesiąca, kultury poddano dalszej propagacji poprzez założenie trzech rodzajów kultur z jednej kultury wyjściowej: kultur z pojedynczych spor, aby utrzymać czystość linii, kultur z 10 spor i kultur z 10 g wyjściowego inokulum. Propagację kultur prowadzono w doniczkach o objętości 0,5 L

z *P. lanceolata* w warunkach opisanych powyżej. Wszystkie opisane rodzaje kultur podlewano dwa razy w tygodniu, naprzemiennie wodą destylowaną i 0,5 × stężoną, zmodyfikowaną pożywką Long-Ashton o obniżonej zawartości fosforu. Skład roztworu podano w tabeli 4. Rozwój mikoryzy w kulturach sprawdzano po upływie 6 miesięcy.

Tabela 4. Skład zmodyfikowanej pożywki Long-Ashton (Hewitt, 1966).

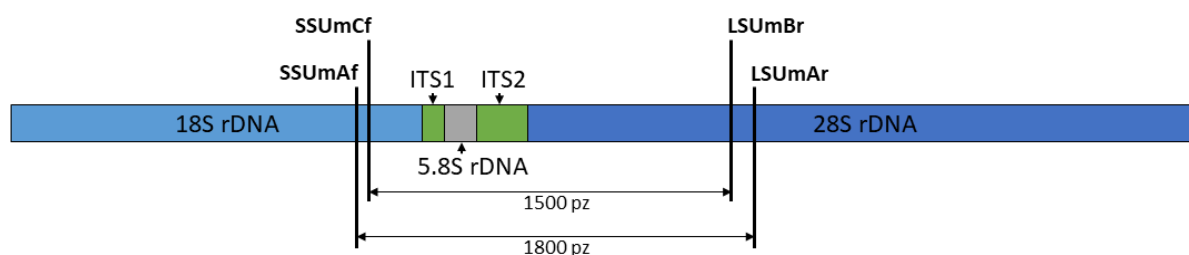
Makroelementy	Stężenie [mM]
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,75
NaNO ₃	1
K ₂ SO ₄	1
CaCl ₂ × 2H ₂ O	2
Na ₂ HPO ₄	0,024
Mikroelementy	
FeNa-EDTA × 2H ₂ O	0,025
MnSO ₄ × 5H ₂ O	0,005
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,00025
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	0,0005
H ₃ BO ₃	0,025
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,0001

3.2.9.2. Identyfikacja gatunkowa wyizolowanych szczepów AMF

W celu identyfikacji gatunkowej szczepów AMF z kultur doniczkowych wyselekcjonowano, w zależności od ich wielkości, od 25 do 100 spor. Większe spory zmiażdżono mikromożdżem, natomiast mniejsze spory pomiędzy dwoma szkiełkami podstawowymi. Homogenat spor zawieszono w 25 µL czterokrotnie rozcieńczonego buforu do polimerazy DreamTaq, inkubowano przez 15 min w temp. 99°C i wirowano (5 min, 10 000 × g). Oczyszczony supernatant przeniesiono do nowej probówki i wykorzystano jako matrycę do reakcji PCR z serią starterów do identyfikacji AMF na podstawie sekwencji SSU rDNA – ITS – LSU rDNA, opracowanych przez Kruger i wsp. (2009). Szczegółowy opis starterów zamieszczono w tabeli 5 i na ryc. 20.

Tabela 5. Zestaw starterów zastosowanych do identyfikacji gatunkowej AMF (Kruger i wsp., 2009; zmodyfikowano).

Starter	Sekwencja nukleotydowa 5'→3'	Docelowe taksony AMF
SSUmAf1	TGG GTA ATC TTT TGA AAC TTY A	<i>Acaulosporaceae</i> , <i>Archaeosporaceae</i> , <i>Claroideoglomeraceae</i> , <i>Diversisporaceae</i> , <i>Geosiphonaceae</i> , <i>Gigasporaceae</i> , <i>Glomeraceae</i> , <i>Pacisporaceae</i>
SSUmAf2	TGG GTA ATC TTR TGA AAC TTC A	<i>Ambisporaceae</i> , <i>Diversisporaceae</i> , <i>Geosiphonaceae</i> , <i>Paraglomeraceae</i>
SSUmCf1	T CGC TCT TCA ACG AGG AAT C	<i>Archaeosporaceae</i> , <i>Claroideoglomeraceae</i>
SSUmCf2	TAT TGT TCT TCA ACG AGG AAT C	<i>Paraglomeraceae</i>
SSUmCf3	TAT TGC TCT TNA ACG AGG AAT C	<i>Acaulosporaceae</i> , <i>Ambisporaceae</i> , <i>Archaeosporaceae</i> , <i>Diversisporaceae</i> , <i>Geosiphonaceae</i> , <i>Gigasporaceae</i> , <i>Glomeraceae</i> , <i>Pacisporaceae</i>
LSUmAr1	GCT CAC ACT CAA ATC TAT CAA A	<i>Acaulosporaceae</i>
LSUmAr2	GCT CTA ACT CAA TTC TAT CGA T	<i>Gigasporaceae</i>
LSUmAr3	T GCT CTT ACT CAA ATC TAT CAA A	<i>Acaulosporaceae</i> , <i>Claroideoglomeraceae</i> , <i>Diversisporaceae</i> , <i>Geosiphonaceae</i> , <i>Gigasporaceae</i> , <i>Glomeraceae</i> , <i>Pacisporaceae</i>
LSUmAr4	GCT CTT ACT CAA ACC TAT CGA	<i>Paraglomeraceae</i>
LSUmBr1	DAA CAC TCG CAT ATA TGT TAG A	<i>Acaulosporaceae</i> , <i>Archaeosporaceae</i> , <i>Glomeraceae</i> , <i>Pacisporaceae</i>
LSUmBr2	AA CAC TCG CAC ACA TGT TAG A	<i>Acaulosporaceae</i>
LSUmBr3	AA CAC TCG CAT ACA TGT TAG A	<i>Gigasporaceae</i>
LSUmBr4	AAA CAC TCG CAC ATA TGT TAG A	<i>Diversisporaceae</i> , <i>Geosiphonaceae</i> , <i>Glomeraceae</i> , <i>Paraglomeraceae</i>
LSUmBr5	AA CAC TCG CAT ATA TGC TAG A	<i>Claroideoglomeraceae</i> , <i>Gigasporaceae</i>



Ryc. 20. Miejsca przyłączania starterów SSUmAf/SSUmAr i SSUmBf/SSUmBr do sekwencji genów SSU rDNA i LSU rDNA (Kruger i wsp., 2009, zmodyfikowano).

Reakcje PCR przeprowadzono z zastosowaniem polimerazy DreamTaq zgodnie z protokołem producenta. Dodatkowo, do pierwszej reakcji PCR dodano 3 mM MgCl₂ oraz 0,02 mg BSA na 50 µL mieszaniny reakcyjnej. Reakcję przeprowadzono z równomolarną mieszaniną starterów SSUmAf/LSUmAr w termocyklerze C1000 Touch™ (Bio-Rad) w następujących warunkach: 95°C przez 5 min; 34 cykle: 95°C przez 20 s, 51°C przez 30 s, 72°C przez 1 min 45 s; 72°C przez 5 min. Jakość produktów reakcji sprawdzono poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym i w zależności od intensywności uzyskanego prążka, produktów reakcji nie rozcieńczono, lub rozcieńczono 10-krotnie i zastosowano jako matrycę do kolejnej reakcji PCR z równomolarną mieszaniną starterów SSUmCf/LSUmBr, w następujących warunkach: 95°C przez 3 min; 34 cykle: 95°C przez 20 s, 55°C przez 30 s, 72°C przez 1 min 30 s; 72°C przez 15 min. Jakość produktów reakcji sprawdzono poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym, oczyszczono z zastosowaniem zestawu Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System i poddano ligacji z wektorem plazmidowym pGEM® T-Easy zgodnie z protokołem producenta. Wektor z insertem wprowadzono do kompetentnych komórek *E. coli* JM109 metodą szoku cieplnego, zgodnie z instrukcją producenta. Po 1 h inkubacji w temp. 37°C z wytrząsaniem, 100 µL zawiesiny komórek wysiano na podłoże LB z dodatkiem IPTG (0,5 mM), X-Gal (0,1 mg mL⁻¹) i ampicyliny (0,1 mg mL⁻¹). Hodowle inkubowano przez noc w temp. 37°C, po czym stosując selekcję metodą blue-white screening (Sambrook i wsp., 1989), białe kolonie niosące insert przesiano na podłoże LB z ampicyliną (0,1 mg mL⁻¹) i inkubowano przez noc w temp. 37°C. Biomase bakteryjną z wybranych kolonii pobrano drewnianym patyczkiem i wprowadzono do mikropróbówek o objętości 0,2 mL. W celu sprawdzenia obecności właściwych insertów w plazmidach, przeprowadzono reakcję colony PCR ze starterami SSUmCf/LSUmBr w takich samych warunkach, jak opisano powyżej, wydłużając czas wstępnej denaturacji do 15 min. Produkty reakcji poddano analizie restrykcyjnej z zastosowaniem enzymu AluI (EURx, Gdańsk,

Polska), zgodnie z protokołem producenta, a profile restrykcyjne sprawdzono poprzez elektroforezę w 1,5% żelu agarozowym. Z kolonii bakteryjnych niosących właściwy insert wyizolowano plazmidy stosując zestaw GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit zgodnie z protokołem producenta. Sekwencjonowanie plazmidów metodą Sanger'a zlecono firmie Genomed S.A. (Warszawa, Polska). Ocenę jakości sekwencji i ich edycję przeprowadzono w programie Chromas Lite 2.01 i Mega 7.0. Sekwencje poddano przeglądowi wobec referencyjnych sekwencji nukleotydowych *Glomeromycotina* dostępnych w bazie danych NCBI stosując algorytm nucleotide BLAST. Sekwencje zidentyfikowano do gatunku w przypadku co najmniej 97% zgodności sekwencji z sekwencjami referencyjnymi. Dwadzieścia cztery sekwencje reprezentujące poszczególne izolaty oraz szesnaście sekwencji referencyjnych dostępnych w bazie NCBI, zostały uporządkowane i dopasowane stosując algorytm ClustalW w programie Mega 7.0. Drzewo filogenetyczne skonstruowano w oparciu o metodę ML z wartością bootstrap dla 1000 powtórzeń, stosując model substytucji nukleotydów GTR+G.

3.2.10. Ocena rozwoju AMF w obecności fenolu i PAH oraz ich wpływu na poziom stresu oksydacyjnego u AMF i gospodarza roślinnego

3.2.10.1. Założenie kultur doniczkowych AMF z *L. perenne*, skażonych fenolem i PAH

Do przygotowania kultur doniczkowych wykorzystano sterylne podłoże, stanowiące mieszanek bentonitu i płukanego piasku rzecznoego w stosunku 1:9 (v/v) (sterylizacja suchym powietrzem w 180°C przez 3 godziny). Następnie, podłoże skażono roztworem równomolarnej mieszaniny naftalenu, fenantrenu, fluorantenu i pirenu w acetonie oraz wodnym roztworem fenolu, tak aby osiągnąć następujące stężenia związków w podłożu: 0 mg fenolu + 0 mg PAH, 5 mg fenolu + 20 mg PAH, 15 mg fenolu + 60 mg PAH, 30 mg fenolu + 120 mg PAH. Po dodaniu mieszaniny PAH, ale przed dodaniem fenolu, podłoże inkubowano w 100°C przez 30 min w celu odparowania acetonu. Podłożem wypełniono doniczki o objętości 0,5 L, do których wysiano wysterylizowane powierzchniowo nasiona *L. perenne* (5 min w 70% roztworze alkoholu etylowego, płukanie wodą 3 × 5 min, 10 min w 50% roztworze ACE, płukanie wodą 3 × 10 min). Po tygodniu od wykiełkowania siewek założono jednogatunkowe kultury AMF, wprowadzając do doniczek po czterdzieści spor następujących gatunków AMF wyizolowanych ze środowiska zanieczyszczonego: *Funneliformis caledonium*, *Diversispora varaderana* i *Claroideoglossus walkeri*. Mieszane

kultury AMF założono poprzez wprowadzenie piętnastu spor każdego z wymienionych gatunków AMF do tej samej doniczki. Założono również kultury kontrolne, nieinokulowane AMF. Wszystkie układy doświadczalne założono w czterech powtórzeniach. Kultury hodowano przez sześć miesięcy w pokoju hodowlanym, zgodnie z warunkami opisanymi w rozdziale 3.2.7.1., podlewając je dwa razy w tygodniu, naprzemiennie wodą destylowaną i zmodyfikowaną pożywką Long-Ashton, której skład podano w tabeli 4.

3.2.10.2. Pomiar biomasy i długości pędów roślin

Rośliny ostrożnie oddzielono od podłoża poprzez ręczne wytrząsanie i płukanie korzeni w wodzie. W celu oceny wzrostu roślin, zmierzono długość najdłuższego pędu każdej z roślin w doniczce, obliczając wartość średnią. Następnie, pobrano po 0,5 g świeżej biomasy z liści i korzeni do oznaczeń enzymatycznych i zamrożono w temp. -20°C . Zważono świeżą biomasę pędów i korzeni, po czym suszono ją w 70°C przez 48 h. Suchą biomasę pędów określono osobno dla każdej rośliny, natomiast suchą biomasę korzeni określono dla całości systemu korzeniowego w doniczce, w związku z niemożliwością rozdzielenia poszczególnych systemów korzeniowych.

3.2.10.3. Ocena kolonizacji mikoryzowej korzeni *L. perenne*

Materiał do oceny kolonizacji mikoryzowej stanowiły niewielkie fragmenty korzeni, które oddzieliły się od systemu korzeniowego podczas płukania. Korzenie zakonserwowano w 70% roztworze alkoholu etylowego. Ocenę kolonizacji mikoryzowej przeprowadzono wg. metody Trouvelota, opisaną w rozdziale 3.2.2.1.

3.2.10.4. Szacowanie liczby spor AMF w podłożu

Do określenia liczby spor AMF, z każdej doniczki pobrano 50 g podłoża. Izolację i liczenie spor przeprowadzono wg. metody opisaną w rozdziale 3.2.3.1.

3.2.10.5. Ocena poziomu stresu oksydacyjnego oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych w korzeniach i liściach

W celu oceny poziomu stresu oksydacyjnego oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych w korzeniach i liściach, 0,5 g tkanek roślinnych zhomogenizowano, poprzez ich utarcie w moździerzu z odrobiną sterylnego piasku kwarcowego i 2,5 mL buforu PBS. Homogenat wirowano przez 5 min przy $8000 \times g$. Pobrany supernatant przechowywano w temp. -80°C do dalszych oznaczeń. Wykonano następujące oznaczenia: stopień peroksydacji lipidów, stężenie 8-OHdG, a także aktywność dysmutazy nadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) oraz peroksydazy (POX), z zastosowaniem odpowiednich zestawów: OxiSelect™ TBARS Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone), DNA Damage Competitive ELISA Kit (Invitrogen), Superoxide Dismutase Assay Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Montana, Stany Zjednoczone), Amplex® Red Catalase Assay Kit (Invitrogen) oraz Amplex® Red Peroxidase Assay Kit (Invitrogen). Oznaczenia przeprowadzono metodą kolorymetryczną na płytkach 96-dołkowych, które odczytywano przy określonej długości fali z użyciem czytnika Biolog MicroStation (Biolog). Homogenaty tkankowe rozcieńczono 5-krotnie do oznaczeń peroksydacji lipidów, 8-OHdG i aktywności SOD oraz 20-krotnie do oznaczeń aktywności CAT i POX, w odpowiednich buforach reakcyjnych. Oznaczenia wykonano w dwóch powtórzeniach technicznych.

3.2.10.6. Ocena poziomu stresu oksydacyjnego oraz aktywności enzymów antyoksydacyjnych w sporach AMF

W celu oceny poziomu stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych w sporach AMF, spory poddano homogenizacji w mikroprobówkach z zastosowaniem mikromoździerza i zawieszono w buforze PBS, aby otrzymać $\text{OD}_{600} = 0,4$. Do oznaczeń poziomu stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych wykorzystano zestawy wymienione w rozdziale 3.2.8.5.

3.2.11. Analizy statystyczne

Istotność różnic w parametrach fizykochemicznych gleby sprawdzono z zastosowaniem dwuczynnikowego testu Brunner-Dette-Munka (BDM, Brunner i wsp, 1997), natomiast istotność różnic w parametrach kolonizacji mikoryzowej korzeni oszacowanych metodą Trouvelouta i qPCR, wskaźnikach biomasy AMF w glebie, profilach PLFA i NLFA, sprawdzono dwuczynnikową analizą wariancji (ANOVA). Badanymi czynnikami były gleba z badanych terenów (Kalina/Kontrola) i gatunek rośliny (*P. trivialis*/*Ph. australis*). W przypadku określenia interakcji pomiędzy czynnikami w testach BDM lub ANOVA, przeprowadzono odpowiednie testy post-hoc: nieparametryczny test Conovera po teście BDM lub test HSD Tukey'a po teście ANOVA, aby zidentyfikować istotne różnice ($P < 0,05$) pomiędzy terenem zanieczyszczonym i kontrolnym dla każdego gatunku rośliny. W przypadku braku interakcji, w testach post-hoc wzięto po uwagę tylko główny czynnik.

Istotność różnic w indeksach α -bioróżnorodności społeczności AMF opartych na analizach DGGE i NGS sprawdzono trójczynnikową analizą ANOVA, z badaną glebą, gatunkiem rośliny i rodzajem próbki (gleba/korzenie) jako czynnikami. W przypadku zidentyfikowania badanej gleby jako głównego czynnika i braku interakcji pomiędzy czynnikami, przeprowadzono dwuczynnikową analizę ANOVA, z gatunkiem rośliny i rodzajem próbki jako czynnikami, a następnie test HSD Tukey'a, aby zidentyfikować istotne różnice ($P < 0,05$) w indeksach bioróżnorodności społeczności AMF związanych z roślinami pobranymi z tego samego terenu.

Analizując β -bioróżnorodność społeczności AMF w oparciu o NGS, istotność grupowania społeczności AMF na dendrogramie Yue i Claytona oparto na kryterium parsymonii (Slatkin i Maddison, 1990). Istotność rozkładu społeczności AMF względem osi NMDS testowano za pomocą analizy wariancji molekularnej (AMOVA- ang. analysis of molecular variance) oraz sprawdzając homogeniczność wariancji (HOMOVA – ang. analysis of the homogeneity of molecular variance).

Pomiędzy parametrami fizykochemicznymi gleby i wszystkimi parametrami uzyskanymi z analiz kolonizacji mikoryzowej korzeni, biomasy AMF w glebie, profili PLFAs/NLFAs w glebie, a także wskaźnikami α -bioróżnorodności obliczonymi na podstawie profili DGGE genu SSU rDNA oraz sekwencjonowania genu LSU rDNA, obliczono macierz korelacji Spearmana.

Na podstawie profili PLFA, DGGE oraz MOTUs, przeprowadzono kanoniczną analizę korespondencyjną (CCA – ang. canonical correspondance analysis). Istotność rozkładu prób względem obu osi CCA sprawdzono dwuczynnikową analizą ANOVA, z gatunkiem rośliny i badaną glebą jako czynnikami.

Istotność różnic w parametrach badanych w eksperymencie doniczkowym z *L. perenne*, takich jak wzrost i biomasa roślin, kolonizacja mikoryzowa korzeni, stres oksydacyjny i aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkankach roślinnych, oraz liczba spor AMF w podłożu, sprawdzono dwuczynnikową analizą ANOVA, z typem inokulacji mikoryzowej oraz stopniem zanieczyszczenia fenolem i PAH jako czynnikami. W przypadku określenia interakcji pomiędzy czynnikami przeprowadzono test HSD Tukey’a, aby zidentyfikować istotne różnice ($P < 0,05$) pomiędzy roślinami nieinokulowanymi i inokulowanymi różnymi gatunkami AMF, pod wpływem różnego stopnia skażenia. W przypadku braku interakcji pomiędzy czynnikami, w teście HSD wzięto po uwagę tylko główny czynnik. Istotność różnic w parametrach stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych w sporach różnych gatunków AMF ($P < 0,05$) sprawdzono jednoczynnikową analizą ANOVA i testem HSD Tukey’a, ze stopniem skażenia fenolem i PAH jako czynnikiem.

Analizy ANOVA i testy HSD Tukey’a przeprowadzono w programie Statistica 12.5 PL (StatSoft, Kraków, Polska). Test BDM i test Conovera przeprowadzono w programie R (R Core Team, Wiedeń, Austria) z pakietem asbio (Acho, 2019). Analizę CCA przeprowadzono w programie Past 3.14. Test parsymonii oraz analizy AMOVA i HOMOVA przeprowadzono w programie Mothur 1.39.

4. Wyniki

4.1. Właściwości fizykochemiczne gleby

Wyniki analiz fizykochemicznych i zawartości fenolu i PAH w glebie przedstawiono w tabelach 6 i 7.

Tabela 6. Właściwości fizykochemiczne gleby pobranej z badanych terenów.

Parametry glebowe	Kalina (teren zanieczyszczony)		Kokotek (teren kontrolny)	
	<i>P. trivialis</i>	<i>Ph. australis</i>	<i>P. trivialis</i>	<i>Ph. australis</i>
	Mediana ± IQR	Mediana ± IQR	Mediana ± IQR	Mediana ± IQR
pH H ₂ O	7,08 ± 0,39 ^a	7,20 ± 0,21 ^a	6,52 ± 0,68 ^c	6,92 ± 0,18 ^b
pH KCl	7,62 ± 0,59 ^a	7,32 ± 0,93 ^a	6,65 ± 0,25 ^b	6,59 ± 0,25 ^b
Wilgotność [%]	7,00 ± 2,00 ^a	7,00 ± 2,00 ^a	3,5 ± 2,25 ^b	5,5 ± 5,75 ^a
Przewodność [μS]	742,00 ± 504,50 ^a	825,00 ± 661,00 ^a	90,75 ± 100,82 ^b	54,15 ± 19,00 ^c
Zawartość SOM [%]	5,00 ± 1,38 ^a	4,77 ± 1,69 ^a	4,14 ± 1,36 ^a	2,44 ± 1,78 ^a
Azot całkowity [%]	0,61 ± 0,05 ^a	0,68 ± 0,05 ^a	0,61 ± 0,04 ^b	0,61 ± 0,02 ^b

^{a, b, c} litery wskazują na różnice istotne statystycznie z $P < 0,05$ (dwuczynnikowy test BDM, test Conovera). IQR – zakres międzykwartylowy.

Tabela 7. Stężenie fenolu i PAH w próbkach gleby okołokorzeniowej *P. trivialis* i *Ph. australis*.

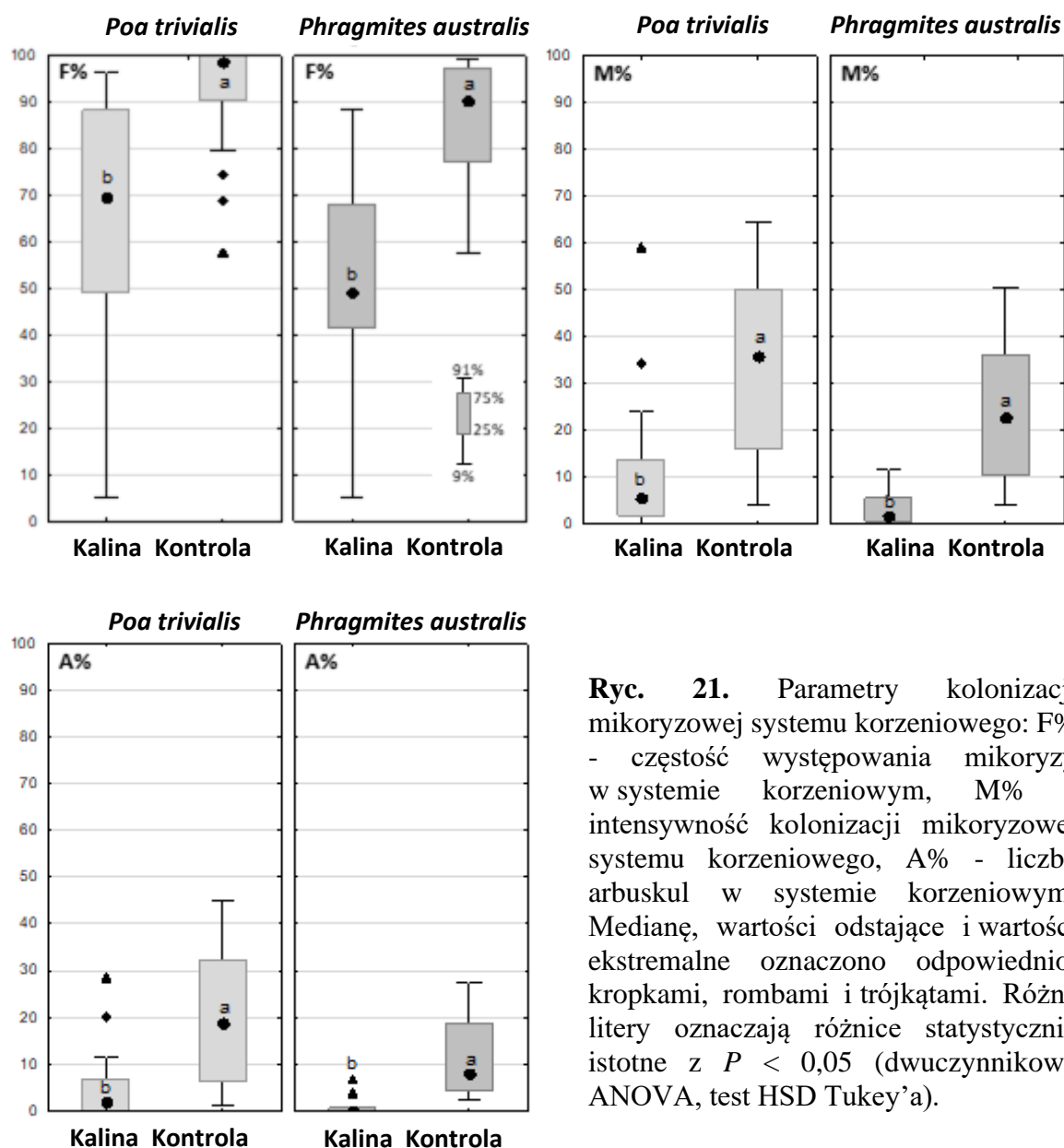
Stężenia fenolu i PAH w glebie zanieczyszczonej [mg kg gleby ⁻¹]							
	Fenol*	NAH	PHE	FLU	PYR	DBA	ΣPAH
<i>Poa trivialis</i>							
Zakres	98,09	2,39	1,00	3,15	4,55	6,14	39,79
	- 2813,76	- 77,15	- 52,20	- 86,41	- 87,40	- 38,25	- 503,4
Mediana	1090,20	3,78	3,39	7,28	8,05	9,85	70,86
± IQR	± 739,20	± 16,64	± 9,58	± 6,46	± 23,34	± 10,56	± 124,53
<i>Phragmites australis</i>							
Zakres	100,01	1,96	0,87	4,7	4,65	5,32	27,74
	- 2653,95	- 82,18	- 57,4	- 97,65	- 89,31	- 30,69	- 538,45
Mediana	1061,56	3,69	3,45	7,58	7,9	41,83	72,91
± IQR	± 702,21	± 14,17	± 9,58	± 9,84	± 23,88	± 10,42	± 142,35

Nie znaleziono różnic istotnych statystycznie pomiędzy badanymi gatunkami roślin. Stężenia zanieczyszczeń w glebie pobranej z terenu kontrolnego były poniżej granicy wykrywalności.

* Średnia ± odchylenie standardowe. NAH – naftalen, PHE – fenantren, FLU – fluoranten, PYR – piren, DBA – dibenzo[a,h]antracen.

4.2. Kolonizacja mikoryzowa korzeni roślin

Poziom kolonizacji mikoryzowej korzeni pobranych z terenu skażonego i nieskażonego różnił się znacznie pomiędzy badanymi gatunkami roślinami. Intensywność kolonizacji mikoryzowej wahała się od umiarkowanej ($M\% = 5\% - 65\%$) na terenie nieskażonym, do niskiej ($M\% = 0\% - 25\%$) na terenie skażonym (Ryc. 21). Wartości $F\%$, $A\%$ (Ryc. 21), oraz ilość kopii genu SSU rDNA AMF w korzeniach (Tabela 8), również były znacząco niższe w próbach pobranych wokół skażonego stawu Kalina. W systemach korzeniowych *Ph. australis* obserwowano jedynie śladową kolonizację mikoryzową lub nie występowała ona wcale.



Ryc. 21. Parametry kolonizacji mikoryzowej systemu korzeniowego: $F\%$ - częstość występowania mikoryzy w systemie korzeniowym, $M\%$ - intensywność kolonizacji mikoryzowej systemu korzeniowego, $A\%$ - liczba arbuskul w systemie korzeniowym. Medianę, wartości odstające i wartości ekstremalne oznaczono odpowiednio, kropkami, rombami i trójkątami. Różne litery oznaczają różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (dwuczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a).

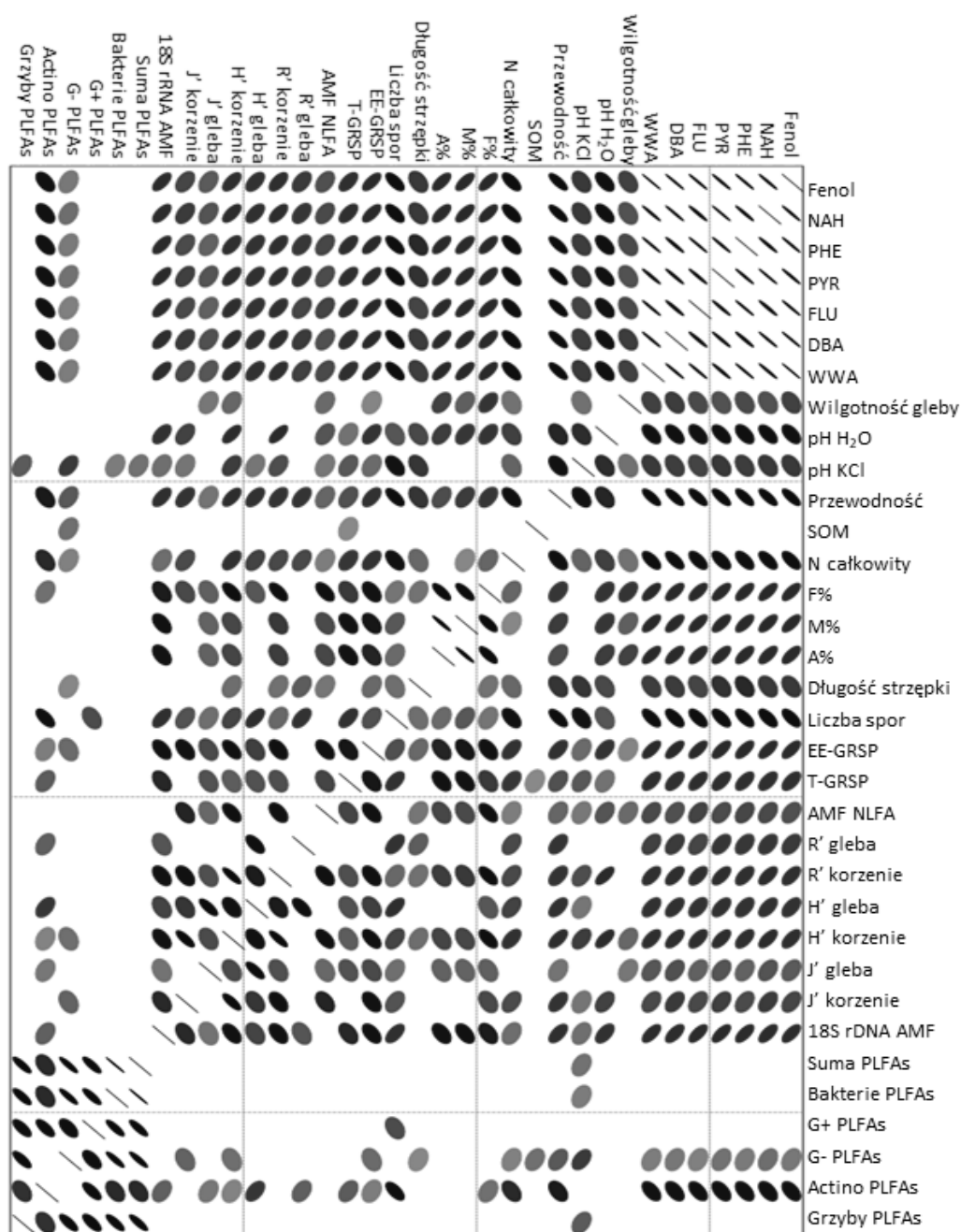
Tabela 8. Wskaźniki biomasy i rozwoju AMF w próbach korzeni (R) i gleby (S) dla *P. trivialis* (PT) i *Ph. australis* (PA) pobranych z terenu zanieczyszczonego stawu Kalina (K) i niezanieczyszczonego stawu Kokotek (C).

WSKAŹNIK	Próbka	Średnia \pm SD	P - czynniki			Wariancja wyjaśniona przez glebę (%)
			Badana gleba	Gatunek rośliny	Teren \times roślina	
Liczba kopii genu SSU rDNA [log liczby kopii genu g ⁻¹ s.m. gleby]	K_PT_R	6,38 \pm 0,46 ^b	<0,001	0,362	0,121	92,8
	K_PA_R	6,12 \pm 0,45 ^b				
	C_PT_R	6,89 \pm 0,16 ^a				
	C_PA_R	6,96 \pm 0,24 ^a				
Długość strzępki [m g ⁻¹ s.m. gleby]	K_PT_S	3,92 \pm 1,85 ^a	<0,001	0,054	<0,001	50,4
	K_PA_S	1,99 \pm 1,02 ^b				
	C_PT_S	1,46 \pm 1,01 ^b				
	C_PA_S	1,80 \pm 0,58 ^b				
Liczba spor g ⁻¹ s.m. gleby	K_PT_S	52 \pm 24 ^a	<0,001	0,363	0,015	87,7
	K_PA_S	62 \pm 28 ^a				
	C_PT_S	28 \pm 4 ^b				
	C_PA_S	16 \pm 5 ^b				
16 ω 5c NLFA [nmol g ⁻¹ s.m. gleby]	K_PT_S	7,75 \pm 6,98 ^b	<0,001	<0,001	0,001	47,62
	K_PA_S	2,96 \pm 2,12 ^b				
	C_PT_S	42,43 \pm 23,13 ^a				
	C_PA_S	9,18 \pm 9,52 ^b				
EE-GRSP [mg kg ⁻¹ s.m. gleby]	K_PT_S	3,21 \pm 1,42 ^c	<0,001	0,081	0,030	88,7
	K_PA_S	3,42 \pm 1,66 ^c				
	C_PT_S	10,02 \pm 3,38 ^a				
	C_PA_S	6,79 \pm 2,15 ^b				
T-GRSP [mg kg ⁻¹ s.m. gleby]	K_PT_S	39,39 \pm 4,94 ^{bc}	<0,001	0,246	0,007	74,6
	K_PA_S	24,60 \pm 5,79 ^c				
	C_PT_S	59,13 \pm 25,38 ^{ab}				
	C_PA_S	67,08 \pm 29,65 ^a				

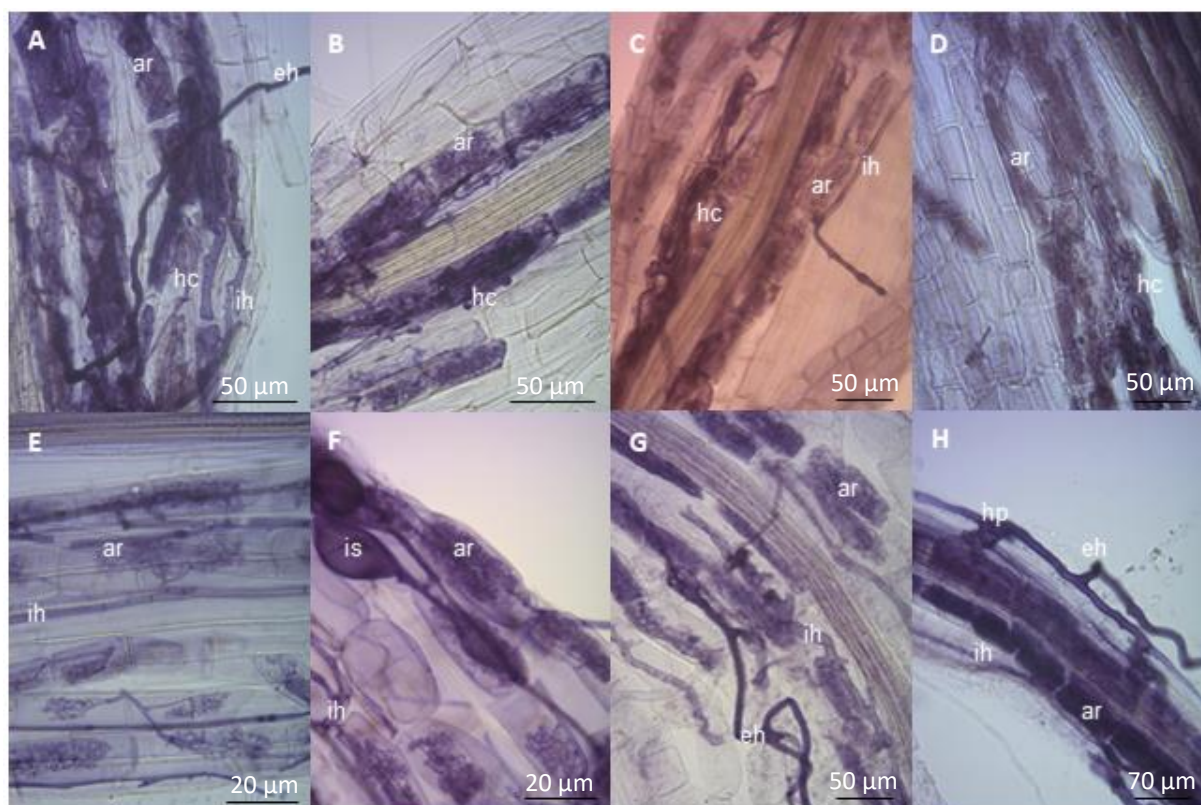
^{a, b, c} litery wskazują na różnice istotne statystycznie z $P < 0,05$ (trójczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a).

Parametry kolonizacji mikoryzowej wykazały negatywną korelację ze stężeniami fenolu i PAH w glebie (Ryc. 22). Pomimo, iż parametry kolonizacji mikoryzowej były nieco wyższe w przypadku *P. trivialis* niż *Ph. australis*, różnice te nie były statystycznie istotne. Dwuczynnikowa analiza ANOVA wskazała na glebę jako główny czynnik wpływający na poziom kolonizacji mikoryzowej oraz na brak interakcji pomiędzy glebą a gatunkiem

gospodarza roślinnego. Ponadto, w korzeniach roślin pobranych z różnych terenów, obserwowano odmienne typy kolonizacji mikoryzowej (Ryc. 23). W korzeniach pochodzących z terenu zanieczyszczonego, stwierdzono jedynie obecność typu *Arum*, podczas gdy w korzeniach z terenu kontrolnego wyróżniono oba typy, *Arum* i *Paris*.



Ryc. 22. Macierz korelacji Spearmana pomiędzy parametrami fizykochemicznymi gleby, wskaźnikami biomasy, długości ERH i liczby spor AMF, indeksami bioróżnorodności AMF obliczonymi na podstawie analizy profili DGGE i biomasą mikroorganizmów obliczoną na podstawie zawartości PLFAs. Nachylenie elipsy w górę lub w dół świadczy o pozytywnej lub negatywnej korelacji. Im cieńsza, ciemniejsza i mocniej nachylona elipsa, tym silniejsza korelacja. Brak symbolu oznacza brak istotnej korelacji



Ryc. 23. Struktury tworzone przez AMF w korzeniach wybarwionych roztworem atramentu w occie: ar – arbuskule, eh – strzępka zewnętrzkorzeniowa, ih – strzępka wewnętrzkorzeniowa, hc – zwoje strzępki. **A, B:** Korzenie *P. trivialis* pobrane z terenu kontrolnego. **C, D:** Korzenie *Ph. australis* pobrane z terenu kontrolnego. **E, F:** Korzenie *P. trivialis* pobrane z terenu zanieczyszczonego. **G, H:** Korzenie *Ph. australis* pobrane z terenu zanieczyszczonego.

4.3. Liczba spor, długość strzępki i biomasa AMF oraz zawartość białek spokrewnionych z glomalinami w glebie

Wynik dwuczynnikowej analizy ANOVA wskazał na badaną glebę jako główny czynnik wpływający na zawartość GRSP, długość ERH, liczbę spor i biomasę AMF w glebie (Tabela 8). Stwierdzono również interakcję pomiędzy glebą a gatunkiem rośliny. Liczba spor i długość ERH były istotnie wyższe w glebie zanieczyszczonej. Natomiast, stężenia GRSP i 16ω5c NLFA były niższe w glebie z terenu zanieczyszczonego, w porównaniu do gleby z terenu niezanieczyszczonego. Istotnie wyższe stężenie T-GRSP w glebie niezanieczyszczonej stwierdzono tylko w glebie okołokorzeniowej *Ph. australis*. Nie znaleziono istotnych różnic w stężeniu T-GRSP w glebie okołokorzeniowej roślin rosnących na tym samym terenie. Stężenie EE-GRSP w glebie na terenie kontrolnym było

szczególnie wysokie w próbach związanych z *P. trivialis*. Stężenie EE-GRP było również pozytywnie skorelowane ze stężeniem 16 ω 5c NLFA w glebie (Ryc. 22).

4.4. Biomasa głównych grup mikroorganizmów w glebie okołokorzeniowej na podstawie zawartości fosfolipidowych kwasów tłuszczowych

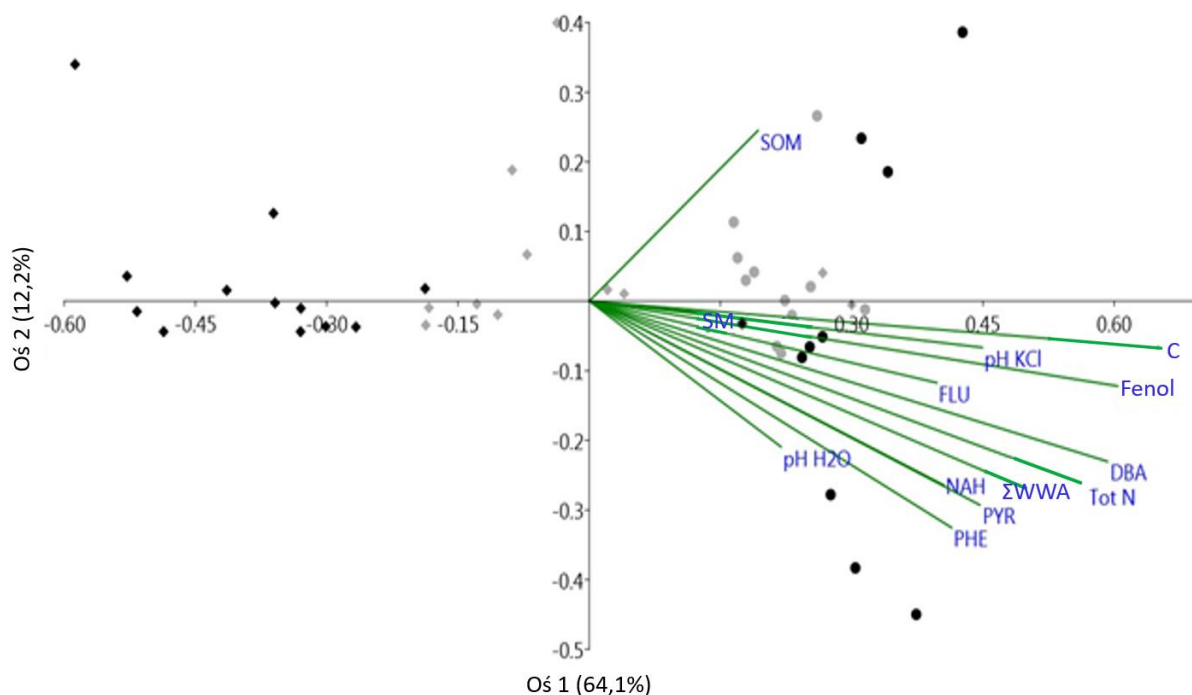
Dwuczynnikowa analiza ANOVA wskazała na brak istotnych różnic w całkowitej zawartości PLFAs jako wskaźnika ogólnej biomasy mikroorganizmów, bakterii i grzybów saprofitycznych, pomiędzy glebą okołokorzeniową pobraną z terenu zanieczyszczonego i z terenu kontrolnego (Tabela 9). Stężenia PLFAs nie były skorelowane z parametrami fizykochemicznymi gleby, z wyjątkiem PLFAs grzybów saprofitycznych, które wykazały negatywną korelację z pH_{KCl} (Ryc. 22). Pomimo, iż badany teren i gatunek rośliny nie miał wpływu na całkowitą biomasę bakteryjną, w glebie związanej z *Ph. australis* wykazano znaczne różnice w stężeniach PLFAs charakterystycznych dla poszczególnych grup bakterii: promieniowców, bakterii Gram-dodatnich i bakterii Gram-ujemnych. Zawartość PLFAs bakterii Gram-dodatnich w glebie okołokorzeniowej *Ph. australis* z terenu skażonego była bardzo wysoka, jednakże nie wykazała istotnej korelacji z poziomem zanieczyszczenia lub parametrami fizykochemicznymi gleby. Stężenia PLFAs bakterii Gram-ujemnych były najwyższe w glebie okołokorzeniowej *Ph. australis* z terenu kontrolnego i negatywnie skorelowane ze stężeniem fenolu i PAH oraz pH_{KCl}, przewodnością, zawartością SOM i azotem całkowitym (Tabela 9, Ryc. 22). Największe różnice pomiędzy glebą z badanych terenów odnotowano dla PLFAs promieniowców, których stężenia były znacznie wyższe w glebie zanieczyszczonej i pozytywnie skorelowane ze stężeniami zanieczyszczeń, przewodnością i azotem całkowitym (Tabela 9, Ryc. 22). Całkowita zawartość PLFAs bakteryjnych, grzybów saprofitycznych i bakterii Gram-dodatnich nie wykazała istotnej korelacji z parametrami kolonizacji mikoryzowej korzeni, biomasą AMF w glebie i wskaźnikami bioróżnorodności AMF; jednakże, zawartość PLFAs bakterii Gram-ujemnych była pozytywnie skorelowana ze stężeniem EE-GRP i indeksem H' dla społeczności AMF w korzeniach. Zawartość PLFAs promieniowców wykazała negatywną korelację z wartościami F%, EE-GRSP, T-GRSP, ilością kopii genu SSU rDNA AMF w korzeniach oraz wskaźnikami bioróżnorodności społeczności AMF (Ryc. 22). Ponadto, analiza CCA wskazała, iż profile PLFAs charakterystyczne dla gleby związanej z *P. trivialis* i *Ph. australis* były odmiennie kształtowane przez parametry fizykochemiczne gleby oraz

obecne w niej zanieczyszczenia (Ryc. 24). Największe różnice w rozkładzie profili poszczególnych PLFAs wzdłuż osi 2 obserwowano pomiędzy zanieczyszczoną i niezanieczyszczoną glebą związaną z korzeniami *Ph. australis*, wskazując na odpowiednio pozytywne i negatywne korelacje z parametrami glebowymi.

Tabela 9. Zawartość PLFAs głównych grup mikroorganizmów w próbach korzeni (R) i gleby (S) dla *P. trivialis* (PT) i *Ph. australis* (PA) pobranych z terenu zanieczyszczonego stawu Kalina (K) i niezanieczyszczonego stawu Kokotek (C).

PLFAs [nmol g ⁻¹ suchej gleby]	Próbka	Średnia ± SD	P – czynniki			Wariancja wyjaśniona (%)	
			Badana gleba	Gatunek rośliny	Teren × roślina	Badana gleba	Gatunek rośliny
Całkowita biomasa mikroorganizmów	K_PT	108,07 ± 36,81 ^a	0,569	0,048	0,146	4,9	62,2
	K_PA	164,26 ± 67,86 ^a					
	C_PT	143,16 ± 63,18 ^a					
	C_PA	148,70 ± 51,72 ^a					
Bakterie	K_PT	47,77 ± 16,55 ^a	0,647	0,033	0,184	3,1	70,3
	K_PA	73,72 ± 30,28 ^a					
	C_PT	62,50 ± 28,86 ^a					
	C_PA	66,89 ± 23,88 ^a					
Bakterie Gram-dodatnie	K_PT	22,99 ± 8,23 ^b	0,056	0,084	0,029	31,9	25,9
	K_PA	37,59 ± 19,33 ^a					
	C_PT	25,01 ± 11,73 ^b					
	C_PA	22,34 ± 6,82 ^b					
Bakterie Gram-ujemne	K_PT	22,92 ± 7,61 ^b	0,009	0,022	0,730	56,3	42,8
	K_PA	32,80 ± 10,50 ^{ab}					
	C_PT	35,70 ± 17,68 ^{ab}					
	C_PA	43,78 ± 17,78 ^a					
Promieniowce	K_PT	1,87 ± 0,75 ^b	< 0,001	0,767	< 0,001	61,1	0,2
	K_PA	3,33 ± 1,13 ^a					
	C_PT	1,80 ± 1,18 ^b					
	C_PA	0,76 ± 0,39 ^c					
Grzyby saprofityczne	K_PT	7,93 ± 2,85 ^a	0,417	0,074	0,098	9,7	48,7
	K_PA	13,24 ± 6,81 ^a					
	C_PT	11,61 ± 5,36 ^a					
	C_PA	11,77 ± 5,62 ^a					

^{a, b, c} litery wskazują na różnice istotne statystycznie z **P < 0,05** (trójczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a).



ANOVA	Kalina - Kontrola	<i>P. trivialis</i> – <i>Ph. australis</i>
Oś 1	$P < 0,001$	$P = 0,036$
Oś 2	$P = 0,065$	$P = 0,114$

Ryc. 24. Analiza CCA obrazująca wpływ zmiennych środowiskowych na rozkład profili PLFAs w glebie. Kropki i romby reprezentują próby gleby okołokorzeniowej *P. trivialis* (szare) i *Ph. australis* (czarne) odpowiednio, z terenu zanieczyszczonego i niezanieczyszczonego. C – przewodność gleby, DBA – dibenzo[a,h]antracen, FLU – fluoranten, NAH – naftalen, PHE – fenantren, PYR – piren, SM – wilgotność gleby, SOM – zawartość materii organicznej, TotN – azot całkowity.

4.5. Charakterystyka bioróżnorodności społeczności AMF na podstawie profili DGGE genu SSU rDNA

Trójczynnikowa analiza ANOVA profili DGGE genu SSU rDNA AMF wskazała na badaną glebę oraz rodzaj próbki (gleba/korzenie) jako główne zmienne kształtujące α -bioróżnorodność społeczności AMF (Tabela 10, Ryc. 25). Wartości indeksów H' i R' wskazały na niższą bioróżnorodność AMF na terenie zanieczyszczonym niż na terenie niezanieczyszczonym. Indeksy były negatywnie skorelowane ze stężeniem fenolu i PAH w glebie (Tabela 10, Ryc. 22). Bioróżnorodność AMF na obu terenach była niższa w korzeniach niż w glebie. Indeksy bioróżnorodności społeczności AMF w korzeniach wykazały korelację negatywną z parametrami fizykochemicznymi gleby oraz pozytywną z parametrami kolonizacji mikoryzowej (F%, M%, A%, liczba kopii genu SSU rDNA) (Ryc. 22). Różnice w bioróżnorodności AMF pomiędzy badanymi gatunkami roślin były istotne

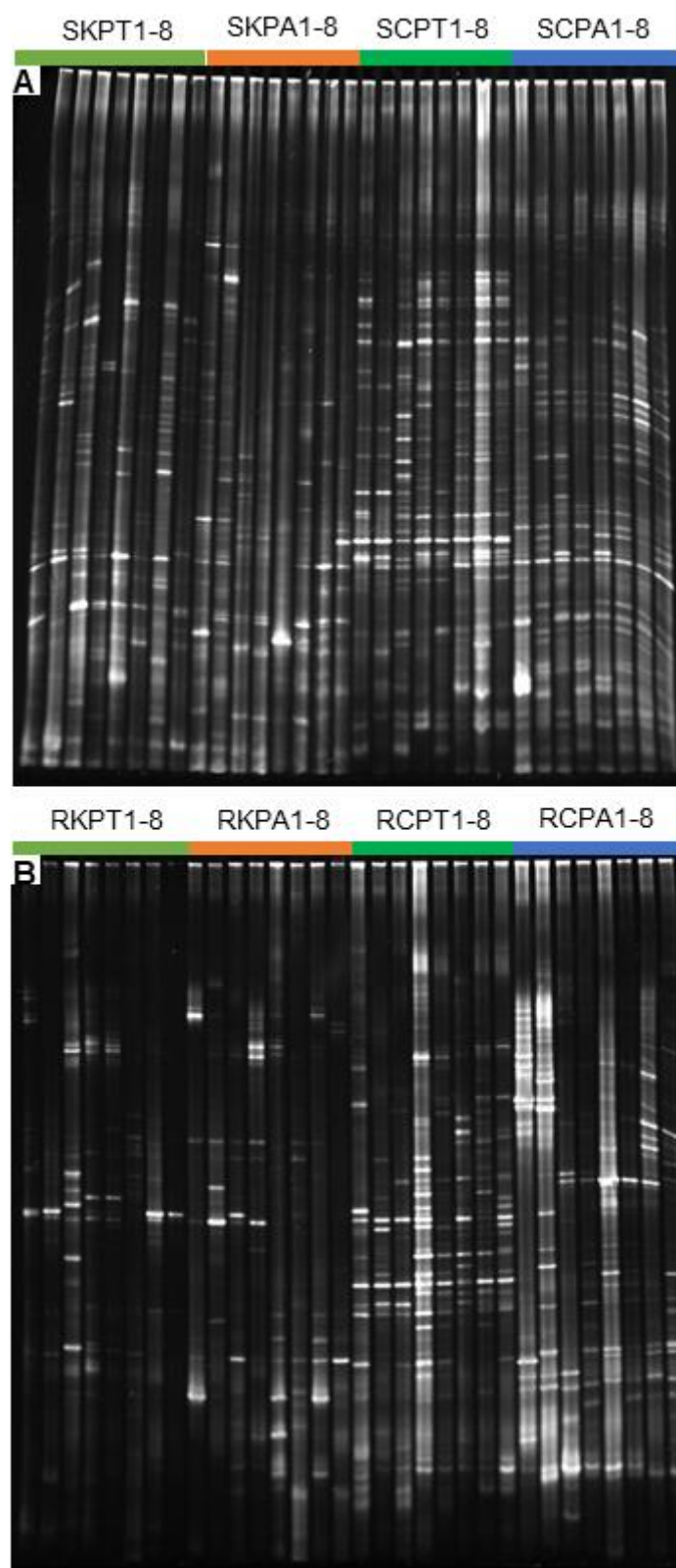
tylko dla terenu niezanieczyszczonego, z najwyższymi wartościami indeksów dla *P. trivialis*. Indeks J' był wyższy dla społeczności AMF na terenie zanieczyszczonym niż na terenie kontrolnym. Nie różnił się istotnie pomiędzy społecznościami AMF związanymi z *P. trivialis* i *Ph. australis* oraz z glebą i korzeniami (Tabela 10).

Tabela 10. Indeksy bioróżnorodności społeczności AMF w próbach korzeni (R) i gleby (S) dla *P. trivialis* (PT) i *Ph. australis* (PA), pobranych z terenu zanieczyszczonego stawu Kalina (K) i niezanieczyszczonego stawu Kokotek (C).

INDEKS BIORÓŻNO- RODNOŚCI	Próbka	Średnia ± SD	P- czynniki			Wariancja wyjaśniona (%)	
			Badana gleba	Gatunek rośliny	Rodzaj próbki	Badana gleba	Rodzaj próbki
Shannona [H']	K_PT_S	2,69 ± 0,23 ^A	<0,001	0,394	<0,001	62,7	23,5
	K_PA_S	2,66 ± 0,32 ^A					
	C_PT_S	2,94 ± 0,12 ^{ab}					
	C_PA_S	3,14 ± 0,20 ^a					
	K_PT_R	2,28 ± 0,42 ^B					
	K_PA_R	2,11 ± 0,51 ^B					
	C_PT_R	2,98 ± 0,23 ^a					
	C_PA_R	2,76 ± 0,17 ^b					
Bogactwa gatunkowego [R']	K_PT_S	31,33 ± 4,58 ^A	<0,001	0,022	<0,001	29,4	32,5
	K_PA_S	38,83 ± 5,95 ^A					
	C_PT_S	36,50 ± 4,81 ^b					
	C_PA_S	46,25 ± 4,33 ^a					
	K_PT_R	24,00 ± 6,69 ^B					
	K_PA_R	22,33 ± 6,04 ^B					
	C_PT_R	35,50 ± 5,99 ^b					
	C_PA_R	30,17 ± 3,83 ^c					
Równomierności [J']	K_PT_S	0,78 ± 0,06 ^A	<0,001	0,104	0,02	67,2	12,5
	K_PA_S	0,73 ± 0,08 ^{AB}					
	C_PT_S	0,82 ± 0,02 ^a					
	C_PA_S	0,82 ± 0,04 ^a					
	K_PT_R	0,72 ± 0,12 ^{AB}					
	K_PA_R	0,65 ± 0,15 ^B					
	C_PT_R	0,81 ± 0,10 ^a					
	C_PA_R	0,81 ± 0,03 ^a					

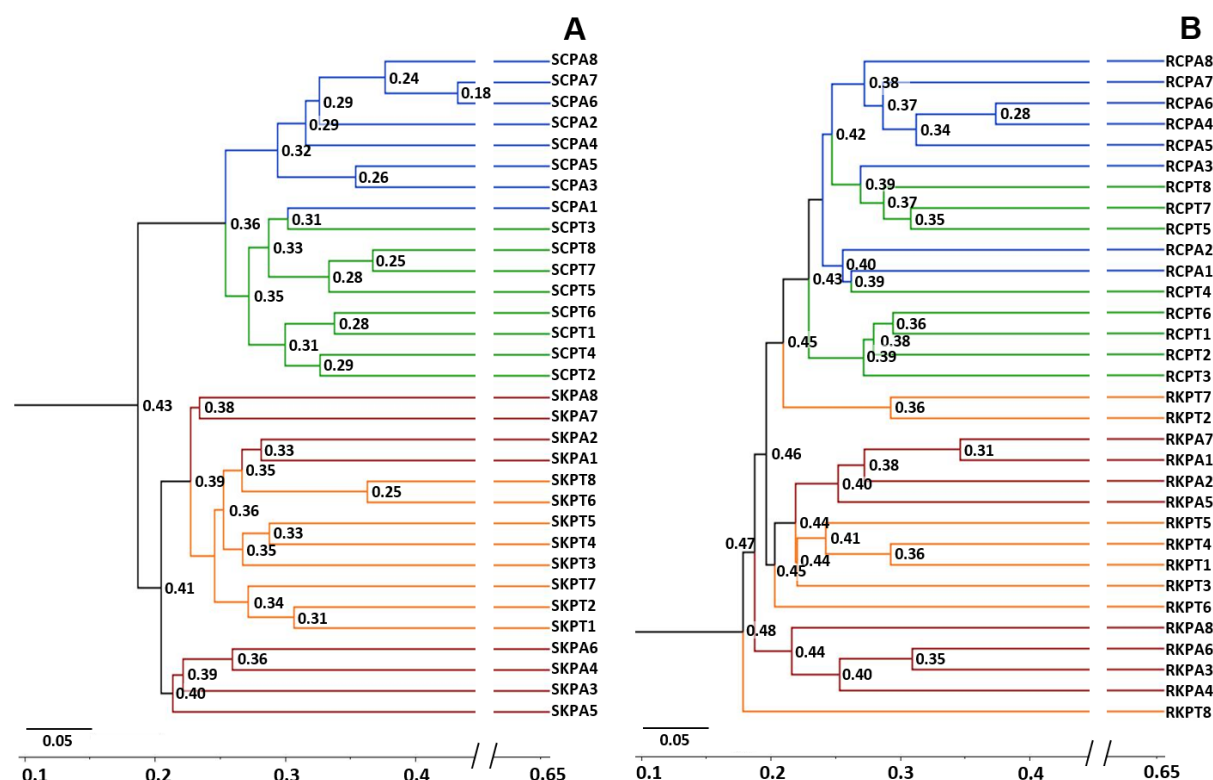
^{A, B} różnice istotne statystycznie z $P < 0,05$ pomiędzy różnymi gatunkami roślin z miejsca zanieczyszczonego (trójczynnikiowa ANOVA, dwuczynnikiowa ANOVA, test HSD Tukey'a).

^{a, b} różnice istotne statystycznie z $P < 0,05$ pomiędzy różnymi gatunkami roślin z miejsca kontrolnego (trójczynnikiowa ANOVA, dwuczynnikiowa ANOVA, test HSD Tukey'a).

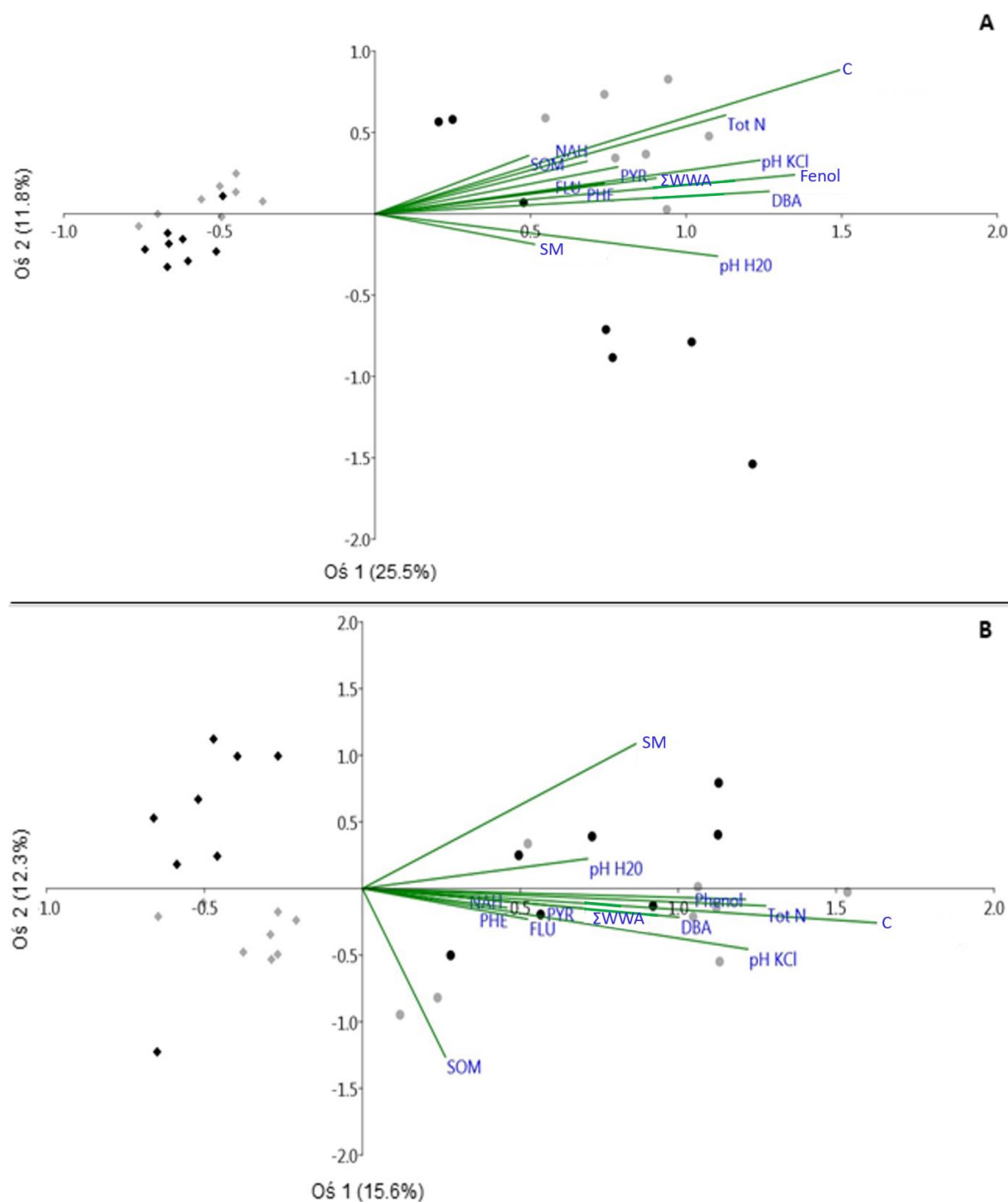


Ryc. 25. Profile DGGE fragmentów genu SSU rDNA AMF z gleby (**A**) i z korzeni (**B**). S – gleba, R – korzenie, C – teren kontrolny, K – teren zanieczyszczony, PT – *P. trivialis*, PA – *Ph. australis*.

Analiza UPGMA (Ryc. 26. A, B) oraz analiza CCA (Ryc. 27. A, B) profili DGGE genu SSU rDNA (Ryc. 25) wykazały bardzo niskie podobieństwo struktury społeczności AMF obu badanych terenów, zwłaszcza w glebie. Rozkład profili DGGE genu SSU rDNA AMF związanych z terenem zanieczyszczonym i z terenem kontrolnym względem osi 2 był znacząco zależny od stężenia fenolu i PAH oraz parametrów fizykochemicznych gleby. Profile DGGE genu SSU rDNA w glebie były bardziej zróżnicowane pomiędzy badanymi gatunkami roślin z terenu nieskażonego, który charakteryzował się wyższą bioróżnorodnością społeczności AMF, w porównaniu do terenu zanieczyszczonego. Ponadto, analiza UPGMA wykazała, że na terenie nieskażonym występowało duże podobieństwo pomiędzy profilami DGGE genu SSU rDNA w glebie. Analiza CCA wykazała, iż profile DGGE genu SSU rDNA z terenu skażonego były bardziej zależne od stężenia zanieczyszczeń i wskaźników fizykochemicznych gleby, w porównaniu do profili z terenu nieskażonego.



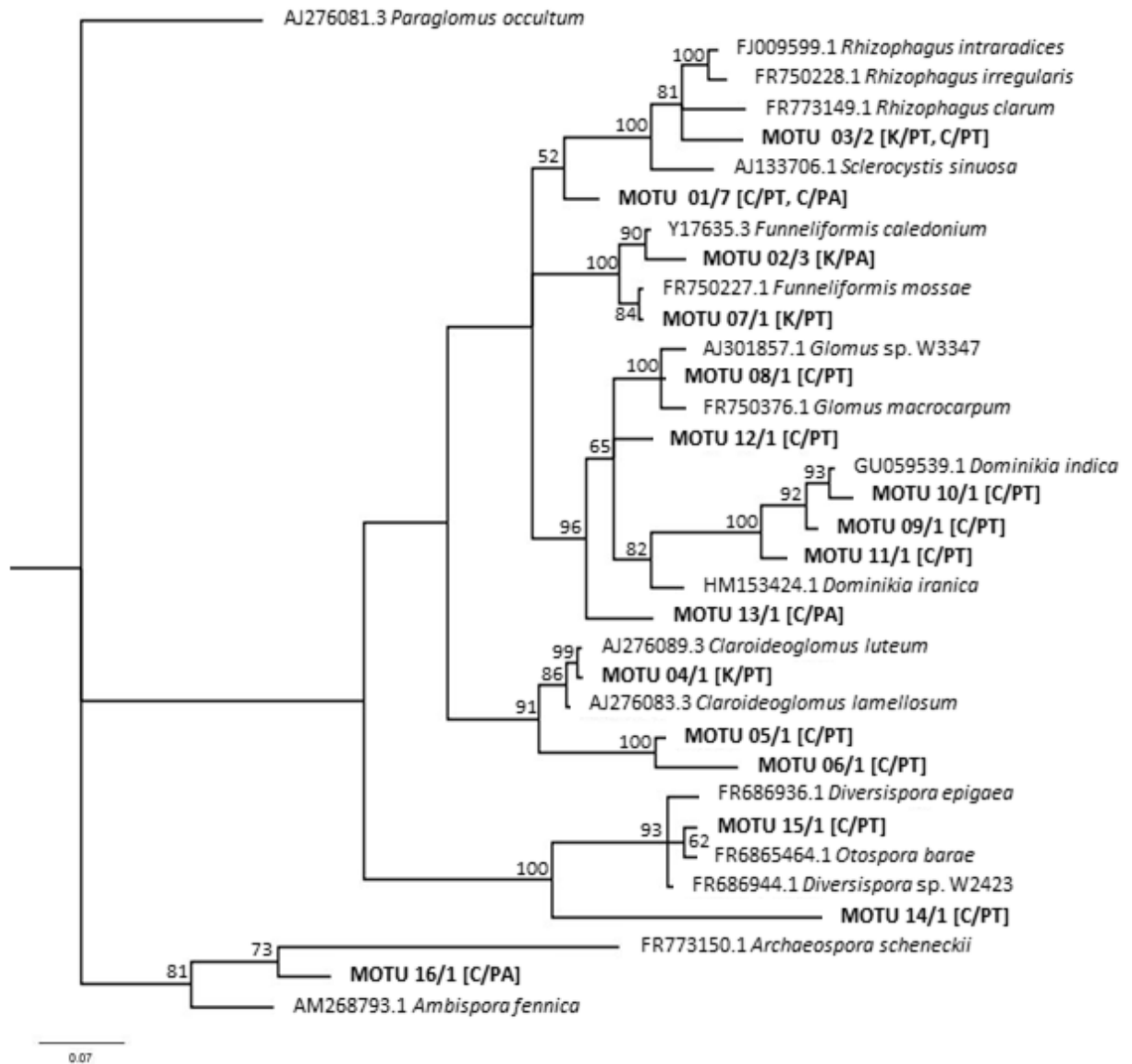
Ryc. 26. Analiza UPGMA na podstawie profili DGGE genu SSU rDNA AMF uzyskanych z gleby (**A**) i z korzeni (**B**). Wartości na węzłach reprezentują współczynnik podobieństwa Jaccarda. R – korzenie, S – gleba, C – teren kontrolny, K – teren zanieczyszczony, PT – *P. trivialis*, PA – *Ph. australis*.



ANOVA	Kalina – Kontrola	<i>P. trivialis</i> – <i>Ph. australis</i>
Oś 1 (A)	$P < 0,001$	$P = 0,67$
Oś 2 (A)	$P = 0,055$	$P < 0,001$
Oś 1 (B)	$P < 0,001$	$P = 0,256$
Oś 2 (B)	$P = 0,043$	$P < 0,001$

Ryc. 27. Analiza CCA obrazująca wpływ zmiennych środowiskowych na rozkład profili DGGE genu SSU rDNA AMF w glebie (A) i w korzeniach (B). Kropki i romby reprezentują próby gleby okołokorzeniowej *P. trivialis* (szare) i *Ph. australis* (czarne) z miejsca zanieczyszczonego i niezanieczyszczonego. C – przewodność gleby, DBA – dibenzo[a,h]antracen, FLU – fluoranten, NAH – naftalen, PHE – fenantren, PYR – piren, SM – wilgotność gleby, SOM – zawartość materii organicznej, TotN – azot całkowity.

W celu identyfikacji gatunków AMF dominujących w korzeniach roślin, z żelu wycięto i poddano sekwencjonowaniu czterdzieści prążków o największej intensywności. Spośród uzyskanych sekwencji, odrzucono piętnaście sekwencji chimerycznych bądź nie należących do *Glomeromycotina*, w tym jedną sekwencję z terenu niezanieczyszczonego i czternaście sekwencji z terenu zanieczyszczonego. Do *Glomeromycotina* należało tylko sześć sekwencji SSU rDNA z korzeni pobranych z terenu zanieczyszczonego, które zostały zgrupowane w cztery MOTUs. Sekwencje otrzymane z korzeni pobranych z terenu kontrolnego zgrupowano w trzynaście MOTUs. MOTUs z terenu zanieczyszczonego zaklasyfikowano do następujących gatunków: *F. caledonium* (MOTU02 występujące w 90% prób korzeni *Ph. australis*); *Rhizophagus* sp. (MOTU03), *F. mosseae* (MOTU07) i *Claroideoglomus luteum* (MOTU04), obecnych w odpowiednio: 60%, 40% i 25% prób korzeni *P. trivialis*. MOTU01 dominujące we wszystkich próbkach korzeni z terenu kontrolnego zaklasyfikowano do *Glomeraceae*, lecz bez przynależności do żadnego ze znanych kladów. MOTUs z terenu niezanieczyszczonego, które wykazały bliską przynależność do rodzajów *Dominikia* (MOTU09/10/11), *Claroideoglomus* (MOTU05/06), *Glomus* (MOTU08) i *Diversispora-Otospora* (MOTU14/15), oraz taksonu *Glomeraceae* sp. (MOTU12), charakteryzowały społeczności AMF związane z korzeniami *P. trivialis*. Natomiast, rodzaje *Archaeospora* sp. (MOTU16, 100% prób korzeni), *Rhizophagus* sp. (MOTU03) i takson *Glomeraceae* sp. (MOTU13) były obecne w korzeniach *Ph. australis* (Ryc. 28).



Ryc. 28. Drzewo filogenetyczne sporządzone na podstawie analizy bayesowskiej z szesnastu MOTUs, referencyjnych sekwencji SSU rDNA AMF oraz sekwencji *Paraglomus occultum* jako grupy zewnętrznej. Wartości węzłów reprezentują bayesowskie wartości prawdopodobieństwa *a posteriori* $\geq 0,50$. W opisach MOTU N/X [S/P]: N, oznacza numer MOTU; X, liczbę zgrupowanych sekwencji; S, badany teren (C – kontrola, K – Kalina); P, gatunek rośliny (PT – *P. trivialis*, PA – *Ph. australis*).

4.6. Charakterystyka bioróżnorodności społeczności AMF na podstawie wysokoprzepustowego sekwencjonowania genu LSU rDNA

4.6.1. α -bioróżnorodność społeczności AMF

W wyniku sekwencjonowania NGS otrzymano 1 262 565 sekwencji należących do *Glomeromycotina*, uzyskując niemal całkowite pokrycie badanych społeczności AMF (indeks Gooda > 99%). Najwięcej sekwencji uzyskano z prób gleby i korzeni *Ph. australis*, z terenu kontrolnego. Najmniej sekwencji uzyskano dla tego samego gatunku z terenu zanieczyszczonego (Tabela 11, 12; Ryc. 29). Łącznie uzyskano 375 MOTUs, w tym 275 MOTUs w korzeniach i 267 MOTUs w glebie. Obserwowana liczba MOTUs na próbkę była bliska szacowanej liczbie MOTUs. Estymator Chao1 wynosił maksymalnie >1 względem obserwowanej liczby MOTUs. Najwięcej MOTUs obserwowano dla terenu kontrolnego, w tym 37 – 68 MOTUs w społecznościach AMF związanych z *Ph. australis* i 15 – 67 MOTUs w społecznościach AMF związanych z *P. trivialis*. Liczba MOTUs obserwowanych dla miejsca zanieczyszczonego była kilkukrotnie niższa, z 4 – 47 MOTUs w społecznościach AMF związanych z *P. trivialis* i 1 – 26 MOTUs w społecznościach AMF związanych z *Ph. australis* (Tabela 12, Ryc. 30).

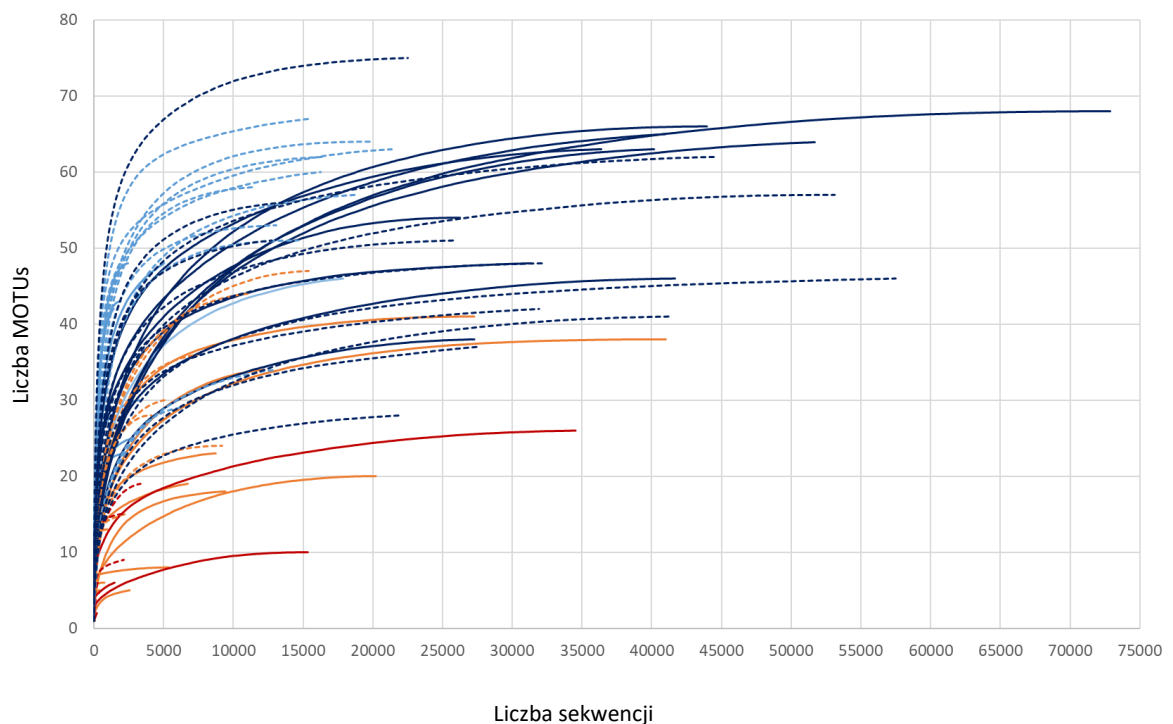
Tabela. 11. Trójczynnikowa analiza ANOVA ($P < 0,05$) wpływu badanej gleby (Kalina/Kontrola), gatunku rośliny (*P. trivialis*/*Ph. australis*) i rodzaju próbki (gleba/korzenie) na zmienność wskaźników α -bioróżnorodności społeczności AMF.

WSKAŹNIKI α – BIORÓŻNORODNOŚCI	P – czynniki				Wariancja wyjaśniona (%)		
	Gleba	Roślina	Typ próbki	Gleba × Roślina	Gleba	Roślina	Gleba × Roślina
Liczba sekwencji	<0,001	0,003	0,501	<0,001	41,78	5,13	41,90
Liczba MOTUs	<0,001	0,014	0,030	<0,001	74,71	2,57	16,76
H'	<0,001	<0,001	0,393	0,029	71,45	18,06	5,57
1/S'	<0,001	0,012	0,875	0,992	80,48	10,83	0
Indeks filogenetyczny	<0,001	0,968	0,660	<0,001	65,68	0	24,92
J'	0,361	0,622	0,583	0,018	6,18	1,79	42,57

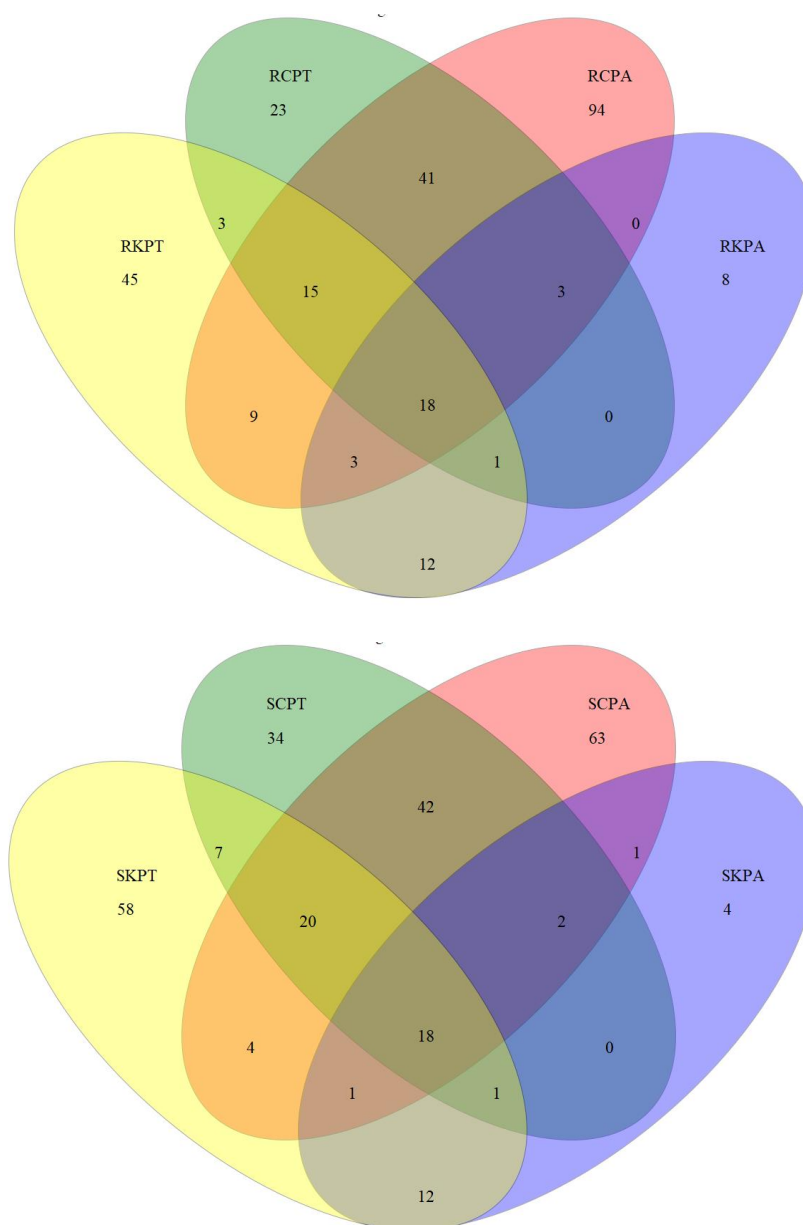
Tabela 12. Wskaźniki bioróżnorodności społeczności AMF w próbach korzeni (R) i gleby (S) dla *P. trivialis* (PT) i *Ph. australis* (PA), pobranych z terenu zanieczyszczonego stawu Kalina (K) i niezanieczyszczonego stawu Kokotek (C).

Próbka	l. sekwencji	l. MOTU	H'	1/S'	Filogen.	J'
K_PT_S	4974 ± 4842 ^{cde}	24 ± 13 ^b	1,48 ± 0,38 ^{ab}	3,15 ± 1,36 ^{bc}	3,39 ± 1,86 ^{bc}	0,51 ± 0,15 ^{ab}
K_PA_S	727 ± 1129 ^e	6 ± 6 ^c	0,73 ± 0,53 ^c	2,12 ± 1,47 ^c	6,00 ± 6,00 ^d	0,51 ± 0,29 ^{ab}
K_PT_R	11273 ± 12452 ^{bd}	19 ± 13 ^b	1,04 ± 0,46 ^{bc}	2,26 ± 0,89 ^c	4,82 ± 4,36 ^b	0,38 ± 0,16 ^b
K_PA_R	4335 ± 10466 ^{de}	6 ± 7 ^c	0,70 ± 0,61 ^c	2,05 ± 1,30 ^c	1,91 ± 3,49 ^{cd}	0,63 ± 0,35 ^{ab}
C_PT_S	13899 ± 5948 ^{bc}	51 ± 16 ^a	1,99 ± 0,63 ^a	4,50 ± 1,97 ^{ab}	9,76 ± 3,39 ^a	0,51 ± 0,15 ^{ab}
C_PA_S	32076 ± 14466 ^a	50 ± 12 ^a	1,79 ± 0,54 ^{ab}	4,34 ± 2,16 ^{ab}	10,98 ± 2,72 ^a	0,46 ± 0,12 ^{ab}
C_PT_R	1855 ± 1444 ^{de}	30 ± 13 ^b	2,17 ± 0,48 ^a	5,83 ± 2,41 ^a	4,07 ± 1,84 ^b	0,66 ± 0,08 ^a
C_PA_R	36075 ± 17831 ^a	54 ± 13 ^a	1,76 ± 0,30 ^{ab}	3,92 ± 1,03 ^{ab}	14,50 ± 5,42 ^a	0,45 ± 0,09 ^{ab}

a, b, c, d litery wskazują na różnice istotne statystycznie z $P < 0,05$ (trójczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a).



Ryc. 29. Krzywe rarefakcji MOTUs dla społeczności AMF związanych z próbkami gleby i korzeni *P. trivialis* (odpowiednio, przerywane i ciągłe jasnoniebieskie linie) oraz z próbkami gleby i korzeni *Ph. australis* (odpowiednio, przerywane i ciągłe ciemnoniebieskie linie) z terenu niezanieczyszczonego, a także z próbkami gleby i korzeni *P. trivialis* (odpowiednio, przerywane i ciągłe pomarańczowe linie) oraz z próbkami gleby i korzeni *Ph. australis* (odpowiednio, przerywane i ciągłe czerwone linie) z terenu zanieczyszczonego.

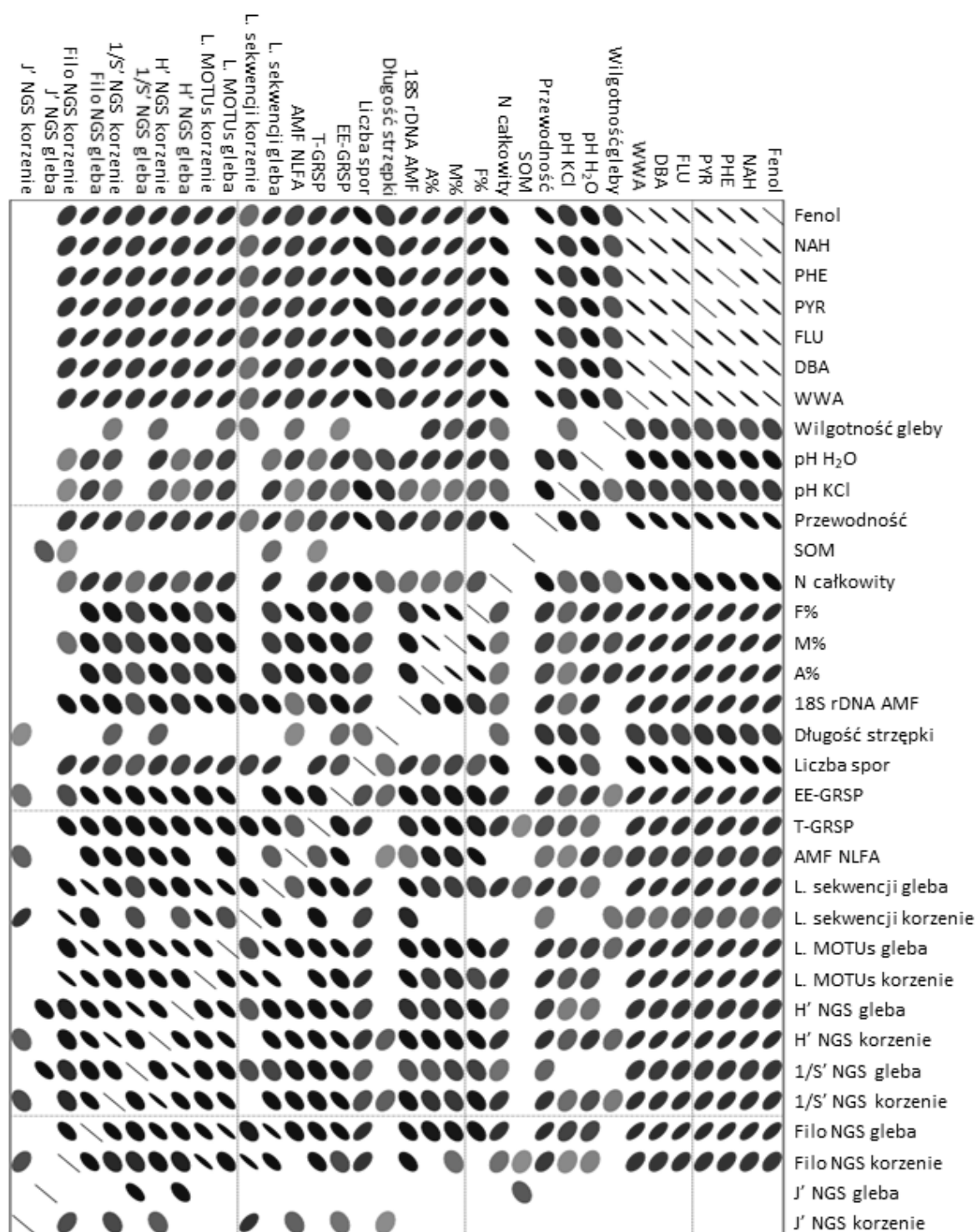


Liczba MOTUs w społecznościach		Liczba MOTUs dzielona pomiędzy społecznościami	
RCPA: 183	SCPA: 151	RCPA i RCPT: 77	SCPA i SCPT: 82
RCPT: 104	SCPT: 124	RKPA i RKPT: 34	SKPA i SKPT: 32
RKPA: 45	SKPA: 39	RCPA i RKPA: 24	SCPA i SKPA: 22
RKPT: 106	SKPT: 121	RCPT i RKPT: 37	SCPT i SKPT: 46

Ryc. 30. Diagramy Venna wskazujące na rozkład liczby MOTUs pomiędzy społecznościami AMF. R – korzenie, S – gleba, C – teren kontrolny, K – teren zanieczyszczony, PT – *Poa trivialis*, PA – *Phragmites australis*.

Trójczynnikowa analiza ANOVA wskazała na badaną glebę jako główny czynnik wpływający na α -bioróżnorodność społeczności AMF, a także na istotność interakcji pomiędzy badaną glebą i gatunkiem rośliny (Tabela 11). Wartości indeksów H' , $1/S'$ oraz indeksu różnorodności filogenetycznej (Tabela 12) wskazały na wyższą bioróżnorodność AMF na terenie niezanieczyszczonym, w porównaniu do terenu zanieczyszczonego fenolem i PAH. Obecność zanieczyszczeń miała bardziej niekorzystny wpływ na α -bioróżnorodność społeczności AMF związanych z *Ph. australis* niż z *P. trivialis*. Indeks J' wskazał na znaczne różnice w liczebności poszczególnych MOTUs w społecznościach AMF, jednakże bez znaczących różnic pomiędzy glebą z badanych terenów, gatunkami roślin oraz pomiędzy glebą i korzeniami (Tabela 12).

Macierz korelacji Spearmana wskazała na negatywny związek wskaźników α -bioróżnorodności z koncentracją węglowodorów i wartościami parametrów fizykochemicznych w glebie, oraz pozytywną korelację z parametrami kolonizacji mikoryzowej korzeni, koncentracją GRSP i AMF NLFA w glebie (Ryc. 31).



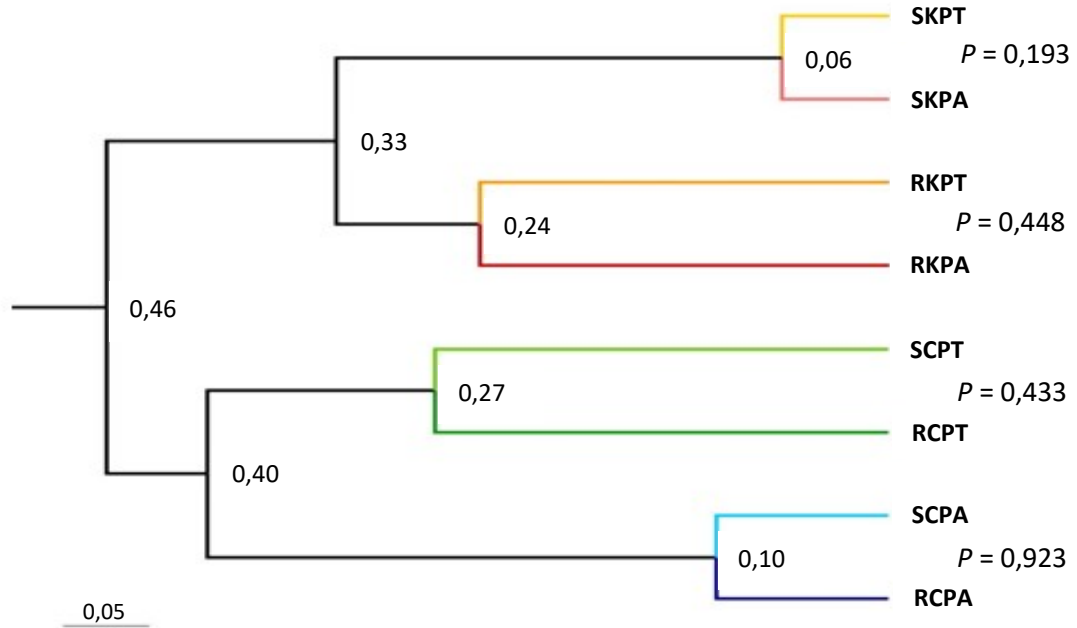
Ryc. 31. Macierz korelacji Spearmana pomiędzy parametrami fizykochemicznymi gleby, parametrami kolonizacji mikoryzowej, stężeniem GRSP, biomasą AMF, długością ERH i liczbą spor AMF w glebie, indeksami bioróżnorodności społeczności AMF obliczonymi na podstawie NGS oraz biomasą mikroorganizmów obliczoną na podstawie zawartości PLFAs. Nachylenie elipsy w górę lub w dół świadczy odpowiednio o pozytywnej lub negatywnej korelacji. Im cieńsza, ciemniejsza i mocniej nachylona elipsa, tym silniejsza korelacja. Brak symbolu oznacza brak istotnej korelacji.

4.6.2. β -bioróżnorodność społeczności AMF

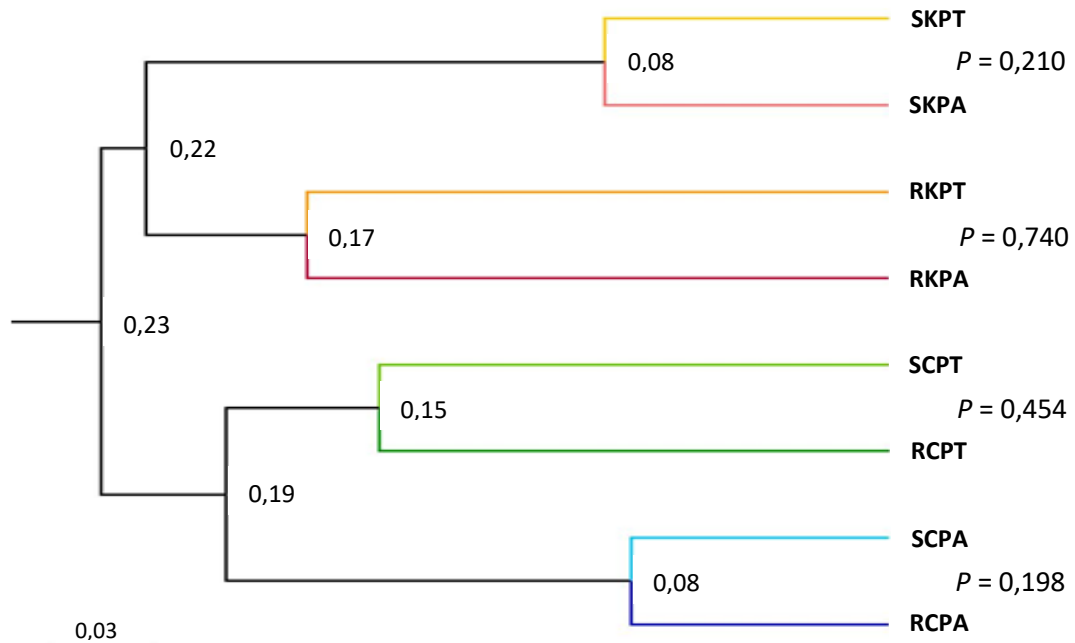
Obie zastosowane miary podobieństwa, indeks Yue-Claytona oraz algorytm UniFrac, podzieliły społeczności AMF z terenu zanieczyszczonego i niezanieczyszczonego na osobne klastry. Społeczności AMF na terenie niezanieczyszczonego były bardziej zróżnicowane pomiędzy badanymi gatunkami roślin, w porównaniu do społeczności AMF na terenie zanieczyszczonego, które były bardziej zróżnicowane pomiędzy glebą i korzeniami niż pomiędzy *P. trivialis* i *Ph. australis*. Test parsymonii potwierdził istotność różnic w strukturach społeczności AMF związanych z glebą z badanych terenów i gatunkami roślin, lecz nie pomiędzy próbami gleby i korzeni (Ryc. 32. A, B, C).

Analiza NMDS oparta na MOTUs (Ryc. 33. A) wskazała na wyraźną separację społeczności AMF związanych z terenem zanieczyszczonego od tych związanych z terenem niezanieczyszczonego, czego nie wykazano w przypadku analizy NMDS opartej na dystansie filogenetycznym (Ryc. 33. B). Analiza NMDS oparta na dystansie filogenetycznym wydzieliła społeczności AMF związane z glebą okołokorzeniową *Ph. australis* z klastra prób związanych z miejscem zanieczyszczonego, umieszczając je bliżej klastra prób związanych z miejscem niezanieczyszczonego. Analiza AMOVA wskazała na istotność różnic w strukturach społeczności AMF związanych z różnymi terenami tylko w przypadku analizy opartej na MOTUs (Ryc. 33. A, B). Analiza HOMOVA wykazała, że wariancje różnorodności filogenetycznej społeczności AMF związanych z terenem zanieczyszczonego i terenem kontrolnym są różne (Ryc. 33. B).

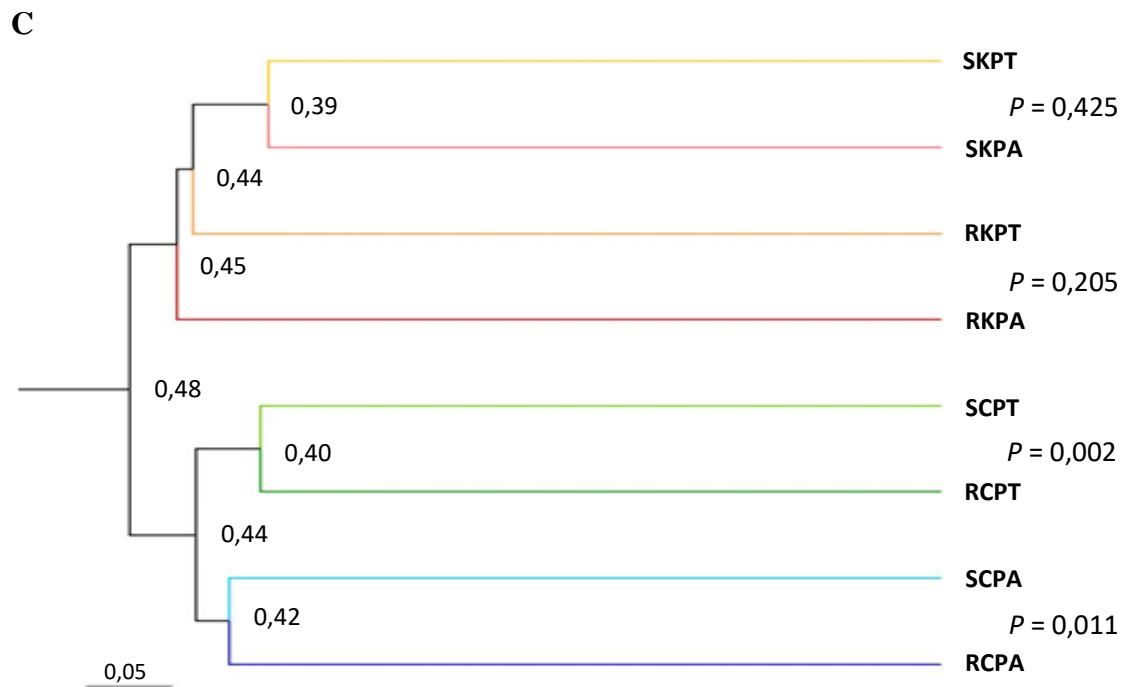
Obie analizy, NMDS i AMOVA, w oparciu o MOTUs i dystans filogenetyczny, wskazały na istotne różnice w β -bioróżnorodności społeczności AMF związanych z *Ph. australis* i *P. trivialis*, a także z glebą i korzeniami (Ryc. 33. A, B). Biorąc pod uwagę istotność interakcji pomiędzy badaną glebą, gatunkiem rośliny i rodzajem próbki na terenie kontrolnym, najbardziej podobne były społeczności AMF związane z korzeniami i glebą okołokorzeniową *P. trivialis*; natomiast, na terenie zanieczyszczonego, społeczności AMF związane z glebą okołokorzeniową *P. trivialis* i *Ph. australis*. Społeczności AMF z terenu zanieczyszczonego związane z *Ph. australis*, o najniższej α -bioróżnorodności, cechowała bardzo wysoka wariancja, w porównaniu do innych badanych społeczności AMF.

A

Grupy	Wynik testu parsymonii	Istotność testu parsymonii
Kontrola-Kalina	11	$P < 0,001$
Phragmites-Poa	20	$P < 0,001$
Korzenie-Gleba	32	$P = 0,632$

B

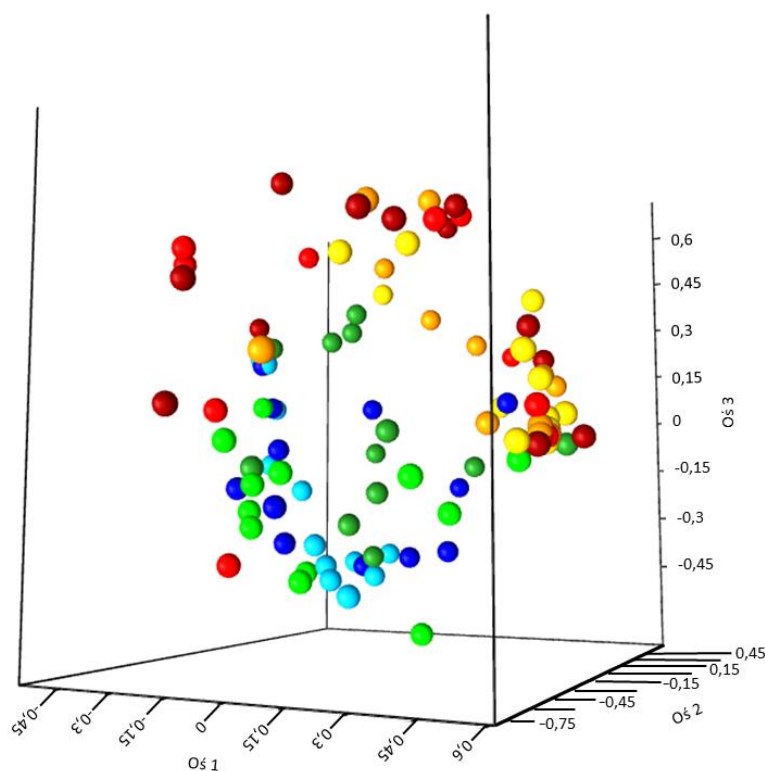
Grupy	Wynik testu parsymonii	Istotność testu parsymonii
Kontrola-Kalina	10	$P < 0,001$
Phragmites-Poa	24	$P = 0,009$
Korzenie-Gleba	28	$P = 0,146$



Grupy	Wynik testu parsymonii	Istotność testu parsymonii
Kontrola-Kalina	10	$P < 0,001$
Phragmites-Poa	24	$P < 0,001$
Korzenie-Gleba	28	$P < 0,001$

Ryc. 32. Analiza skupień w oparciu o miary podobieństwa pomiędzy społecznościami AMF: indeks Yue-Clayton (**A**), metodę UniFrac ważoną (**B**), metodę UniFrac nieważoną (**C**). Liczby przy węzłach odpowiadają wartości współczynnika podobieństwa. Przy dendrogramach zamieszczono wartości prawdopodobieństwa testu parsymonii, wskazujące na istotne różnice pomiędzy poszczególnymi społecznościami AMF z $P < 0,05$. Tabele przedstawiają wyniki testu parsymonii wskazujące na różnice pomiędzy społecznościami AMF związanymi z badanymi terenami, gatunkami roślin i glebą lub korzeniami. R – korzenie, S – gleba, C – teren kontrolny, K – teren zanieczyszczony, PT – *P. trivialis*, PA – *Ph. australis*.

A

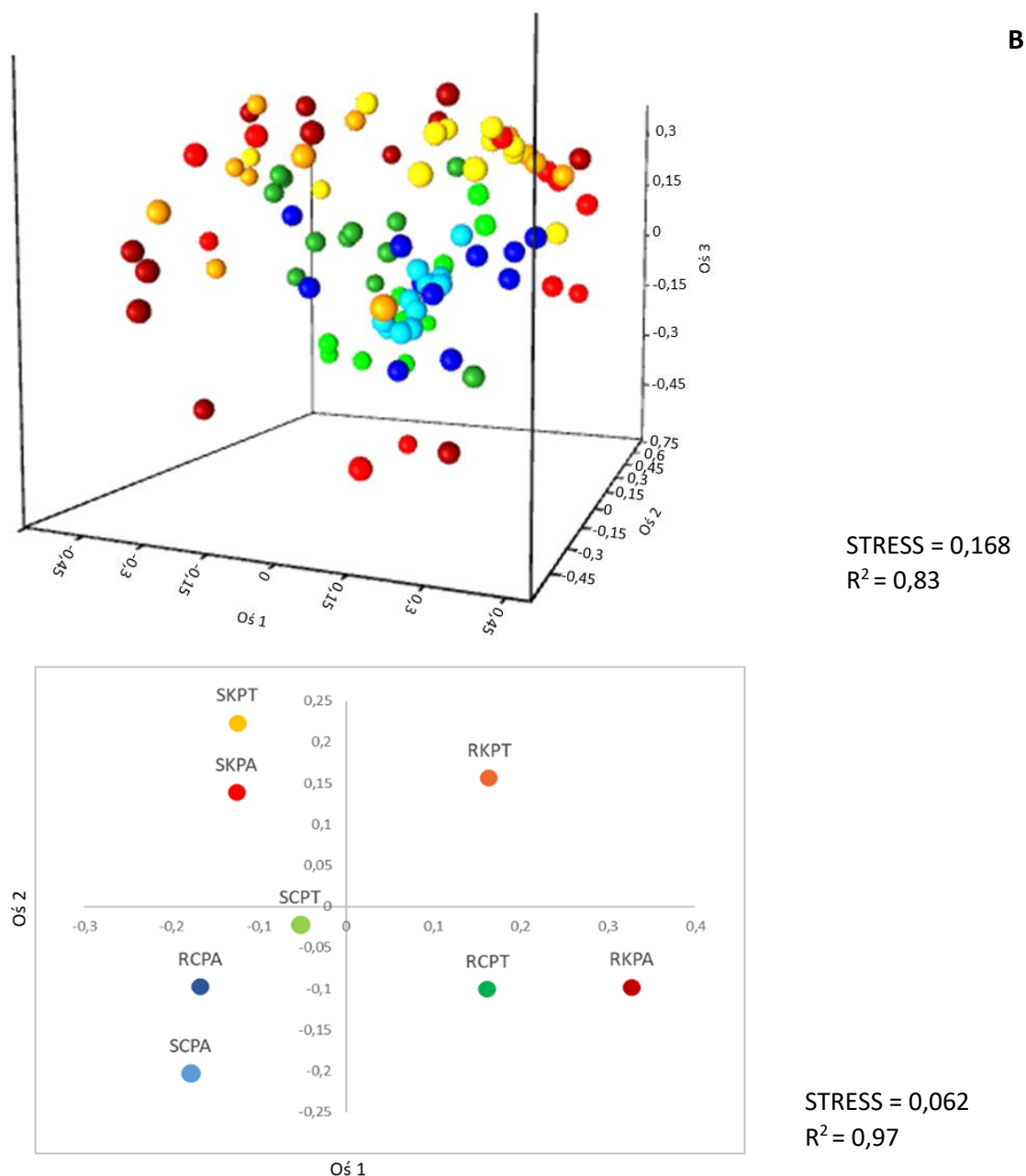


STRESS = 0,165
 $R^2 = 0,72$



STRESS = 0,151
 $R^2 = 0,86$

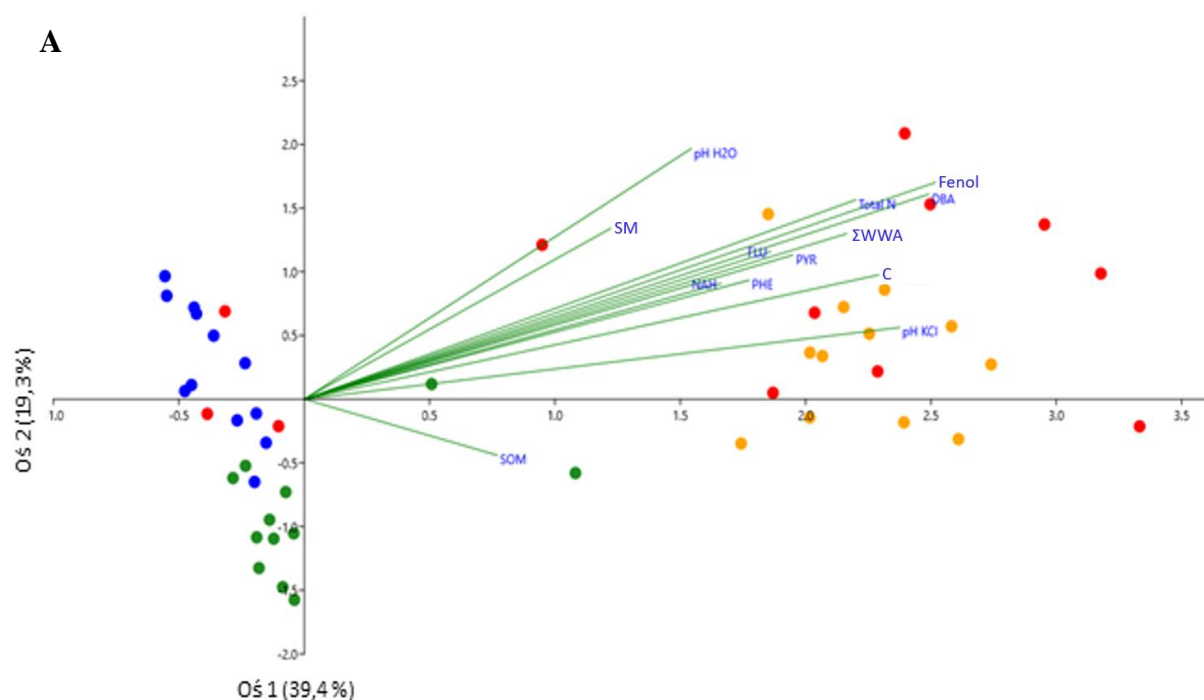
Grupy	AMOVA	HOMOVA
Wszystkie	$P < 0,001$	$P < 0,001$
RKPA-RKPT	$P = 0,446$	$P = 1,000$
SKPA-SKPT	$P = 0,032$	$P = 1,000$
RCPT-SCPT	$P = 0,005$	$P = 1,000$
RCPA-SCPA	$P = 0,187$	$P = 1,000$
Kalina-Kontrola	$P < 0,001$	$P = 1,000$
Phragmites-Poa	$P < 0,001$	$P = 1,000$
Korzenie-Gleba	$P = 0,041$	$P = 1,000$



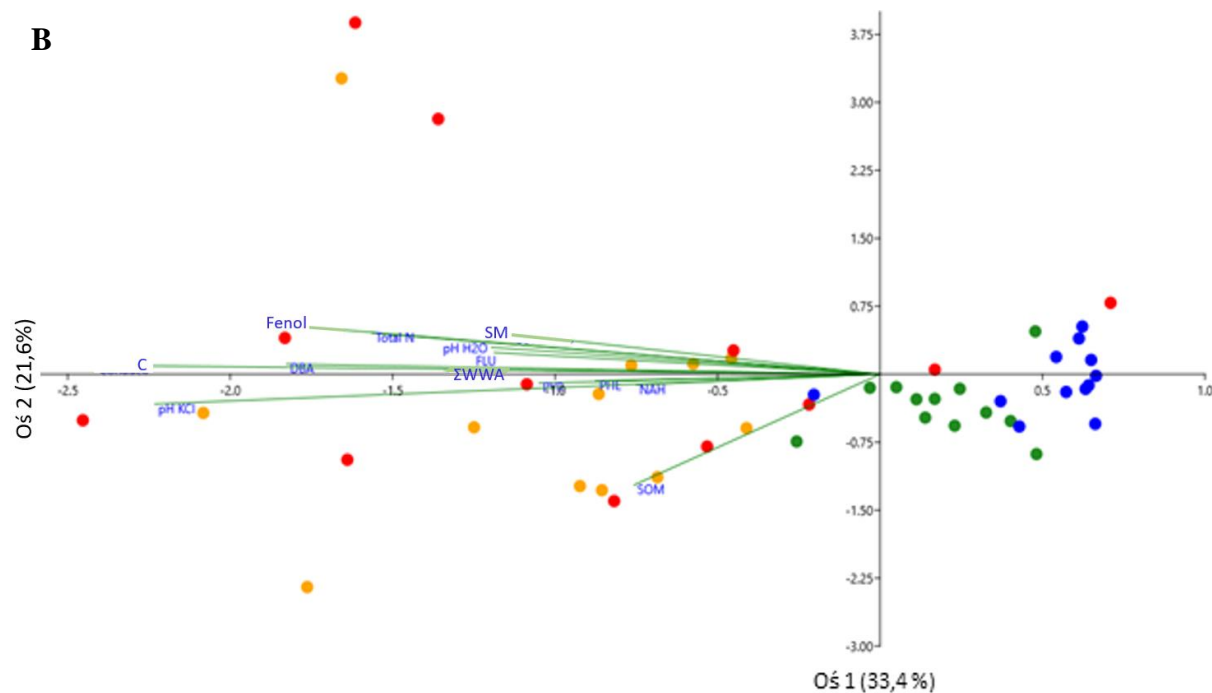
Grupy	AMOVA	HOMOVA
Wszystkie	$P < 0,003$	$P < 0,001$
RKPA-RKPT	$P = 0,613$	$P = 1,000$
RKPA-RCPT	$P = 0,999$	$P = 1,000$
SKPA-SKPT	$P = 0,393$	$P = 1,000$
RCPT-SCPT	$P < 0,001$	$P = 1,000$
RCPA-SCPA	$P = 0,083$	$P = 1,000$
Kalina-Kontrola	$P = 1,000$	$P = 0,014$
Phragmites-Poa	$P = 0,002$	$P = 1,000$
Korzenie-Gleba	$P = 0,033$	$P = 1,000$

Ryc. 33. Analizy NMDS 3D i 2D, w oparciu o indeks Yue i Claytona (A) oraz metodę UniFrac ważoną (B). Tabele przedstawiają wyniki testów AMOVA i HOMOVA, wskazując na istotność różnic pomiędzy badanymi społecznościami AMF z $P < 0,05$. R – korzenie, S – gleba. C – teren kontrolny, K – teren zanieczyszczony. PT – *P. trivialis*, PA – *Ph. australis*.

Analiza CCA poparta dwuczynnikową analizą ANOVA i testem HSD Tukey'a, wykazała bardzo silny wpływ zanieczyszczenia fenolem i PAH, a także właściwości fizykochemicznych gleby, na zróżnicowanie społeczności AMF związanych z zanieczyszczoną i niezanieczyszczoną glebą okołokorzeniową, rozdzielając je na osobne klastry względem osi 1 (Ryc. 34. A). Podobny rozkład uzyskano dla społeczności AMF występujących w korzeniach (Ryc. 34. B). W przeciwieństwie do społeczności AMF związanych z glebą zanieczyszczoną, społeczności związane z glebą niezanieczyszczoną zostały istotnie rozdzielone względem osi 2 na specyficzne dla *P. trivialis* i *Ph. australis* (Ryc. 34. A). Rozdziału prób ze względu gatunek gospodarza roślinnego nie uzyskano dla społeczności AMF w korzeniach (Ryc. 34. B). Ponadto, analiza CCA wskazała na większe podobieństwo pomiędzy społecznościami AMF na terenie niezanieczyszczonym, które zostały zgrupowane w odrębny klaster, w przeciwieństwie do społeczności z terenu zanieczyszczonego, wykazujących znaczne rozproszenie na wykresie (Ryc. 34. A, B).



ANOVA	Kalina - Kontrola	<i>P. trivialis</i> – <i>Ph. australis</i>
Oś 1	$P < 0,001$	$P = 0,042$
Oś 2	$P < 0,001$	$P < 0,001$

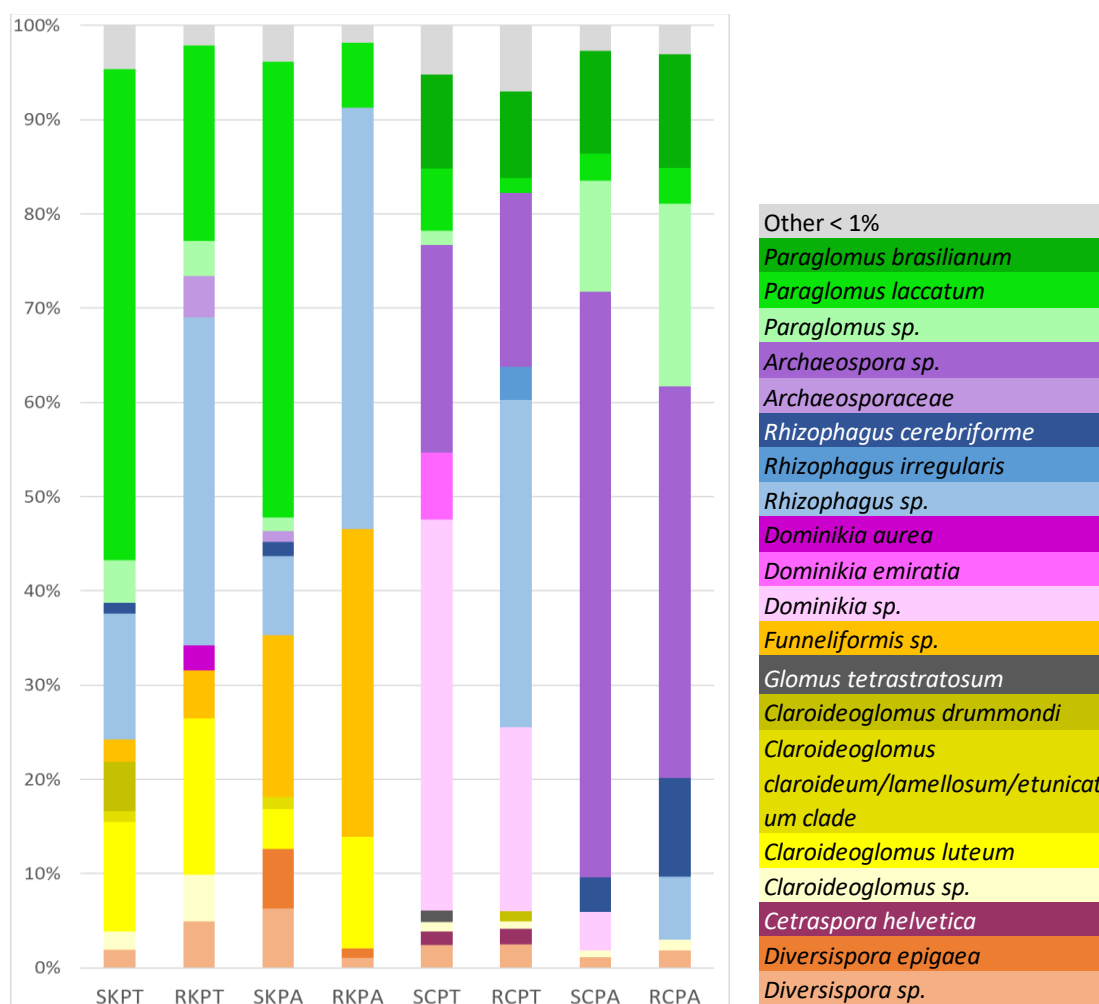


ANOVA	Kalina - Kontrola	<i>P. trivialis</i> – <i>Ph. australis</i>
Oś 1	$P < 0,001$	$P = 0,199$
Oś 2	$P = 0,503$	$P = 0,122$

Ryc. 34. Analiza CCA obrazująca wpływ zanieczyszczeń i parametrów fizykochemicznych gleby na zróżnicowanie społeczności AMF w glebie (**A**) i w korzeniach (**B**). Punkty pomarańczowe i czerwone oznaczają odpowiednio, próby związane z *P. trivialis* i *Ph. australis* na terenie zanieczyszczonym. Punkty zielone i niebieskie oznaczają odpowiednio, próby związane z *P. trivialis* i *Ph. australis* na terenie niezanieczyszczonym. C – przewodność gleby, DBA – dibenzo[a,h]antracen, FLU – fluoranten, NAH – naftalen, PHE – fenantren, PYR – piren, SM – wilgotność gleby, SOM – zawartość materii organicznej, Total N – azot całkowity.

Struktury gatunkowe społeczności AMF związanych z terenem zanieczyszczonym i niezanieczyszczonym były wyraźnie zróżnicowane (Ryc. 35). Społeczności AMF charakterystyczne dla terenu zanieczyszczonego były zdominowane przez *Paraglomus laccatum* w glebie (50 – 55% udziału) oraz *Rhizophagus* sp. w korzeniach (36 – 46% udziału) w przypadku obu gatunków roślin. W terenie niezanieczyszczonym, u badanych gospodarzy roślinnych dominowały różne gatunki AMF. Społeczności AMF związane z *P. trivialis* były zdominowane przez *Dominikia* sp. (44% udziału) w glebie oraz *Rhizophagus* sp., *Dominikia* sp. i *Archaeospora* sp. (odpowiednio, 43%, 21%, 20% udziału) w korzeniach. Społeczności związane z *Ph. australis* były silnie zdominowane przez *Archaeospora* sp. (64% udziału w glebie i 43% w korzeniach). Model DMM podzielił osiem analizowanych społeczności AMF na trzy główne metaspołeczności charakterystyczne dla:

terenu zanieczyszczonego, *Ph. australis* z terenu kontrolnego i *P. trivialis* z terenu kontrolnego (Tabela 13, Ryc. 36). MOTUs, które determinowały metaspółeczność AMF związaną z miejscem zanieczyszczonym, należały do: *P. laccatum*, *Rhizophagus* sp., *C. luteum*, *Funneliformis* sp., *F. mosseae*, *Funneliformis geosporum* i *Dominikia aurea*. MOTUs, które charakteryzowały metaspółeczność AMF związaną z *Ph. australis* na terenie kontrolnym należały do: *Archaeospora* sp., *Paraglomus brasilianum*, *Paraglomus* sp., *Claroideoglomus* sp. i *Claroideoglomus drummondi*. W skład metaspółeczności związanej z *P. trivialis* na terenie kontrolnym wchodziły głównie: *Dominikia* sp., *Dominikia emiratia*, *Paraglomus brasilianum*, *Archaeospora* sp., *Cetraspora helvetica*, *Diversispora* sp. i *Glomus tetrastratosum* (Tabela 13).



Ryc. 35. Struktura gatunkowa badanych społeczności AMF. R – korzenie, S – gleba, C – teren kontrolny, K – teren zanieczyszczony, PT – *P. trivialis*, PA – *Ph. australis*.

Tabela 13. Wartości względnego udziału (%) MOTUs definiujących 60% kompozycji wyróżnionych metaspoleczości AMF w średniej wartości referencyjnej składowej Dirichleta (P0) oraz w trzech składowych DMM (P1, P2, P3).

Gatunek AMF	MOTU	P0	P1	P2	P3	TMD	CMD
<i>Archaeospora sp.</i>	002	3,05	0,55	19,43	7,14	22,96	0,09
<i>Dominikia sp.</i>	007	1,79	0,01	0,83	13,29	14,24	0,15
<i>P. brasilianum</i>	004	2,67	0,54	10,7	5,96	13,45	0,2
<i>P. laccatum</i>	005	6,68	12,3	2,75	3,17	13,07	0,25
<i>Archaeospora sp.</i>	001	2,14	0,23	10,62	2,51	10,76	0,29
<i>Paraglomus sp.</i>	003	2,79	2,46	10,58	1,22	9,68	0,33
<i>Rhizophagus sp.</i>	006	4,29	6,58	1,74	2,52	6,6	0,36
<i>C. luteum</i>	009	1,94	5,26	0,29	0,94	5,97	0,38
<i>F. mossae</i>	012	0,83	4,09	0,04	0,08	4,8	0,4
<i>Rhizophagus sp.</i>	020	2,76	4,49	0,86	1,72	4,68	0,42
<i>Funneliformis sp.</i>	010	0,62	3,31	0	0	3,92	0,43
<i>Rhizophagus sp.</i>	011	3,15	4,12	1,08	2,71	3,48	0,45
<i>P. brasilianum</i>	023	1,46	0,22	0,96	2,52	2,8	0,46
<i>Archaeospora sp.</i>	013	1,19	0,01	0,73	2,15	2,59	0,47
<i>D. emiratia</i>	019	1,29	0,01	0,82	2,01	2,46	0,48
<i>Claroideoglomus sp.</i>	024	1,18	0,01	2,11	0,86	2,43	0,49
<i>Ce. helvetica</i>	033	0,7	0,01	0,08	1,66	2,27	0,5
<i>Rhizophagus sp.</i>	041	1,55	2,22	0,55	1	2,22	0,51
<i>F. geosporum</i>	052	0,4	1,81	0	0	2,2	0,51
<i>Archaeospora sp.</i>	015	1,26	0,01	1,14	1,71	1,82	0,52
<i>Diversispora sp.</i>	027	0,99	0,01	1,39	0,69	1,68	0,53
<i>Dominikia sp.</i>	018	0,66	0,22	0,11	1,26	1,59	0,53
<i>D. emiratia</i>	038	0,64	0,01	0,15	1,1	1,58	0,54
<i>D. aurea</i>	028	0,43	1,34	0	0,19	1,58	0,55
<i>G. tetrastratosum</i>	031	1,39	0,81	0,62	1,61	1,57	0,55
<i>D. emiratia</i>	054	0,67	0,01	0,19	1,09	1,56	0,56
<i>C. drummondi</i>	037	0,96	0,12	1,27	0,56	1,56	0,57
<i>Claroideoglomus sp.</i>	040	0,99	0,01	0,63	1,2	1,55	0,57
<i>Dominikia sp.</i>	030	1,5	0,92	0,79	1,71	1,51	0,58
<i>Claroideoglomus sp.</i>	047	0,58	0,01	0,11	1,04	1,5	0,58
<i>Claroideoglomus sp.</i>	035	1,08	0,12	1,32	0,81	1,47	0,59

MOTUs zostały uszeregowane na podstawie ich wkładu do całkowitej różnicy między średnimi (TMD – ang. total mean difference) wynoszącej 254%, podzielonej na 95%, 93% i 66% względem poszczególnych składowych, oraz skumulowanej różnicy między średnimi (CMD – ang. cumulative mean difference). P1 – Kalina, P2 – Kontrola *Ph. australis*, P3 – Kontrola *P. trivialis*.



Ryc. 36. Dopasowanie modelu DMM dla rosnącej liczby składowych do modelu logarytmicznego.

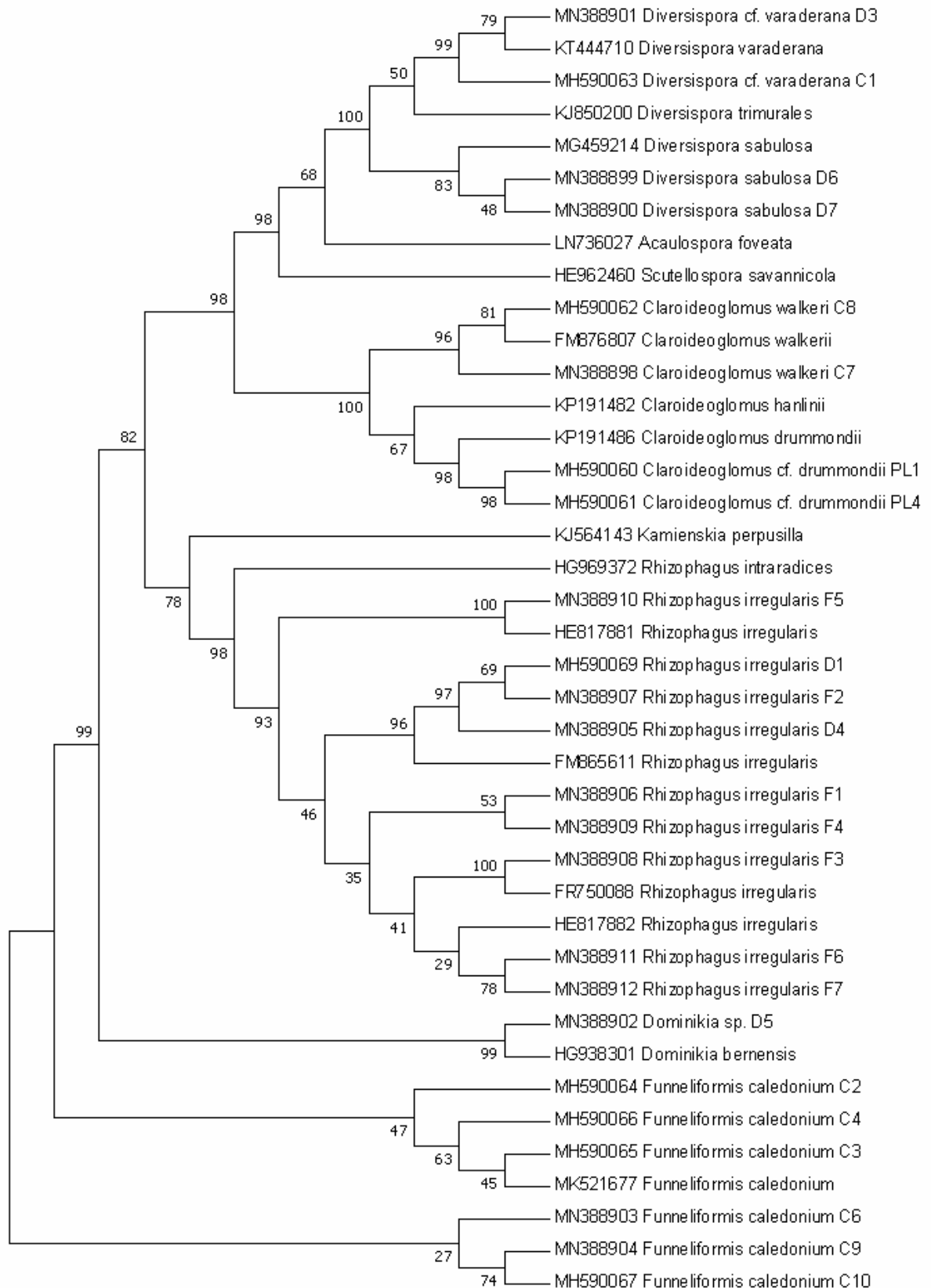
4.7. Charakterystyka wyizolowanych ze środowiska gatunków AMF

Spośród dwustu kultur doniczkowych założonych poprzez inokulację pojedynczą sporą lub klastrem spor AMF, otrzymano dwadzieścia cztery pozytywne kultury mikoryzowe, które zaklasyfikowano do gatunku na podstawie sekwencji genów SSU rDNA – ITS – LSU rDNA. Wyizolowano trzy gatunki AMF z zanieczyszczonej gleby wokół stawu Kalina: *C. walkeri*, *F. caledonium* i *D. varaderana*, oraz cztery gatunki AMF z gleby kontrolnej wokół stawu Kokotek: *Claroideoglossum drummondi*, *Diversispora sabulosa*, *R. irregularis* i nowy gatunek *Dominikia* sp. Opis morfologiczny wyizolowanych gatunków AMF i ich pozycję na drzewie filogenetycznym, wraz z numerem dostępu do odpowiednich sekwencji SSU rDNA – ITS – LSU rDNA w bazie danych GenBank, zamieszczono w tabeli 14 i na ryc. 37.

Tabela 14. Charakterystyka wyizolowanych gatunków AMF.

Gatunek AMF	Nr id.	Pochodzenie	Opis morfologiczny	Nr dostępu w bazie GenBank	Referencje
<i>Claroideoglossum cf. drummondi</i>	PL1	Gleba okołokorzeniowa <i>P. trivialis</i> pobrana z terenu stawu Kokotek	Spory jasnożółte, przejrzyste; ściana złożona z trzech warstw; kształt kulisty lub jajowaty, średnica: (58-)71(-85) μm ; występują pojedynczo w podłożu.	MH590060.1	Błaszowski i wsp., 2006
	PL4			MH590061.1	
<i>Claroideoglossum walkeri</i>	C7	Gleba okołokorzeniowa <i>P. trivialis</i> pobrana z terenu stawu Kalina	Spory białe do jasnożółtych, półprzezroczyste; ściana złożona z trzech warstw; kształt kulisty lub jajowaty, średnica: (55-)81(-95) μm ; występują pojedynczo w podłożu.	MN388898.1	
	C8			MH590062.1	
<i>Diversispora sabulosa</i>	D6	Gleba okołokorzeniowa <i>P. trivialis</i> pobrana z terenu stawu Kokotek	Spory intensywnie żółte lub żółto-pomarańczowe, półprzezroczyste; ściana złożona z dwóch warstw; kształt kulisty lub jajowaty, średnica: (17-)51(-67) μm ; występują pojedynczo w podłożu lub przyczepione do powierzchni korzenia.	MN388899.1	Symanczik i wsp., 2018
	D7			MN388900.1	
<i>Diversispora cf. varaderana</i>	C1	Gleba okołokorzeniowa <i>P. trivialis</i> pobrana z terenu stawu Kalina	Spory intensywnie żółte lub żółto-pomarańczowe, półprzezroczyste; ściana złożona z dwóch warstw; kształt kulisty lub jajowaty, średnica: (60-)75(-90) μm ; występują pojedynczo w podłożu lub przyczepione do powierzchni korzenia.	MH590063.1	Błaszowski i wsp., 2015b
	D3			MN388901.1	
<i>Dominikia sp.</i>	D5	Gleba okołokorzeniowa <i>P. trivialis</i> pobrana z terenu stawu Kokotek	Spory szkliste; ściana złożona z dwóch warstw; kształt kulisty lub jajowaty, średnica:	MN388902.1	Błaszowski i wsp., 2015a

			(19-)25-43(-52) μm; występują w gęstych klastrach.		
<i>Funneliformis caledonium</i>	C2	Gleba okołokorzeniowa <i>P. trivialis</i> pobrana z terenu stawu Kokotek	Spory złoto-żółte do żółto-brązowych; ściana złożona z czterech warstw; przejrzyste; kształt kulisty lub jajowaty, średnica: (180-)259(-320) μm; występują pojedynczo lub w niewielkich klastrach.	MH590064.1	Nicholson i Gerdemann, 1968
	C3			MH590065.1	
	C4			MH590066.1	
	C6			MN388903.1	
	C9			MN388904.1	
	C10			MH590067.1	
<i>Rhizophagus irregularis</i>	D1	Gleba okołokorzeniowa <i>P. trivialis</i> pobrana z terenu stawu Kokotek	Spory szkliste do żółto-brązowych; przejrzyste; ściana złożona z trzech warstw; kształt kulisty, jajowaty, podłużny lub nieregularny; średnica: 70-165 μm; występują pojedynczo, w niewielkich klastrach lub wewnątrz korzeni.	MH590069.1	Błaszkowski i wsp., 2008
	D4			MN388905.1	
	F1	Gleba okołokorzeniowa <i>Ph. australis</i> pobrana z terenu stawu Kokotek		MN388906.1	
	F2			MN388907.1	
	F3			MN388908.1	
	F4			MN388909.1	
	F5			MN388910.1	
	F6			MN388911.1	
	F7			MN388912.1	



Ryc. 37. Drzewo filogenetyczne sporządzone metodą ML, skonstruowane z referencyjnych sekwencji SSU rDNA – ITS – LSU rDNA oraz sekwencji otrzymanych dla wyizolowanych szczepów AMF. Liczby przy węzłach oznaczają wartości bootstrap dla 1000 powtórzeń.

4.8. Rozwój AMF i gospodarza roślinnego w kulturach skażonych fenolem i PAH

4.8.1. Biomasa i wzrost roślin

Skażenie węglowodorami miało negatywny wpływ na wzrost i biomasę *L. perenne* we wszystkich układach badawczych, jednakże obecność mikoryzy znacznie ograniczyła ten niekorzystny efekt. Dwuczynnikowa analiza ANOVA wskazała na interakcję pomiędzy inokulacją mikoryzową oraz stężeniem fenolu i PAH jako czynnikami wpływającymi istotnie na wysokość i biomasę roślin (Tabela 15).

Tabela 15. Wpływ inokulacji mikoryzowej oraz zanieczyszczenia fenolem i PAH na parametry wzrostu roślin (dwuczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$).

Dwuczynnikowa ANOVA	P - czynniki			Wariancja wyjaśniona (%)		
	AMF	Fenol/PAH	AMF × fenol/PAH	AMF	Fenol/PAH	AMF × fenol/PAH
PARAMETRY WZROSTU ROŚLIN						
Wysokość pędów	< 0,001	< 0,001	0,003	45,83	49,31	4,86
Biomasa pędów	< 0,001	< 0,001	< 0,001	22,34	73,83	3,84
Biomasa korzeni	< 0,001	< 0,001	< 0,001	66,20	30,12	3,68
Stosunek biomasy korzenie/pędy	< 0,001	0,110	< 0,001	94,00	0,59	5,41

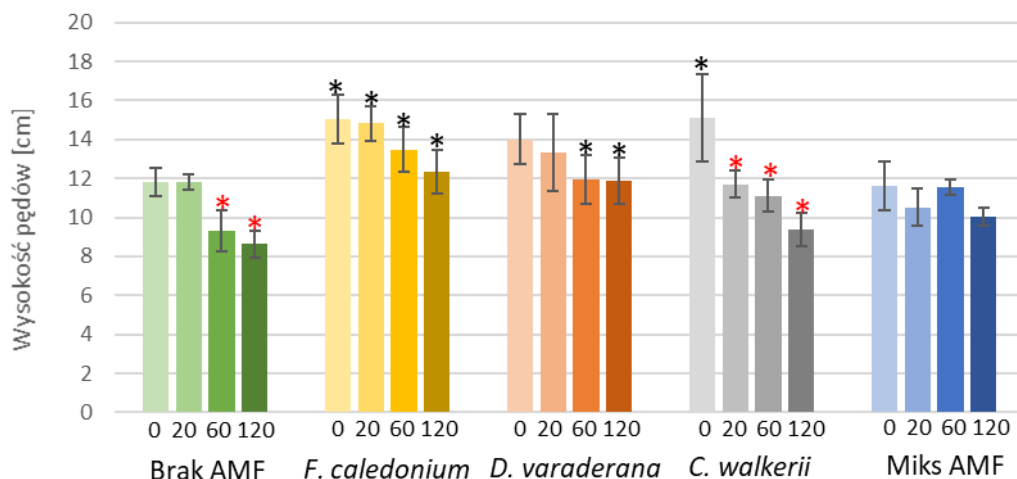
Najwyższe wartości badanych parametrów wzrostu roślin obserwowano w kulturach inokulowanych *F. caledonium* i *D. varaderoana*, które w porównaniu do niemikoryzowej kontroli wpłynęły pozytywnie na wysokość i biomasę pędów *L. perenne*, bez względu na poziom skażenia. *C. walkeri* w bardzo znacznym stopniu zwiększył biomasę i wysokość pędów roślin rosnących w podłożu nieskażonym; jednakże, jego wpływ na wzrost wartości tych parametrów w układach skażonych nie był równie istotny, jak w przypadku pozostałych AMF. W przeciwieństwie do pojedynczych gatunków AMF, wprowadzenie trójgatunkowego inokulum mikoryzowego spowodowało nieznaczny ubytek wysokości i biomasy pędów roślin w układach nieskażonych oraz o niskim stopniu skażenia (5/20 mg fenolu/PAH kg⁻¹), w porównaniu do niemikoryzowej kontroli. Odnotowano natomiast pozytywny wpływ inokulacji trzema gatunkami AMF na wysokość i biomasę pędów przy średnim (15/60 mg fenolu/PAH kg⁻¹) i wysokim (30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹) skażeniu; jednakże, był on nieistotny statystycznie (Ryc. 38, 39, 40. A). Inokulacja mikoryzowa miała również wpływ na pokrój morfologiczny części nadziemnych roślin. Inokulacja

D. varaderana i *F. caledonium* spowodowała, że blaszki liściowe *L. perenne* były dłuższe, szersze i bardziej liczne, w porównaniu do niemikoryzowej kontroli. Inokulacja *C. walkeri* spowodowała, że liści było znacznie więcej, w porównaniu do niemikoryzowej kontroli, natomiast były one cienkie i szybciej usychały (Ryc. 38).

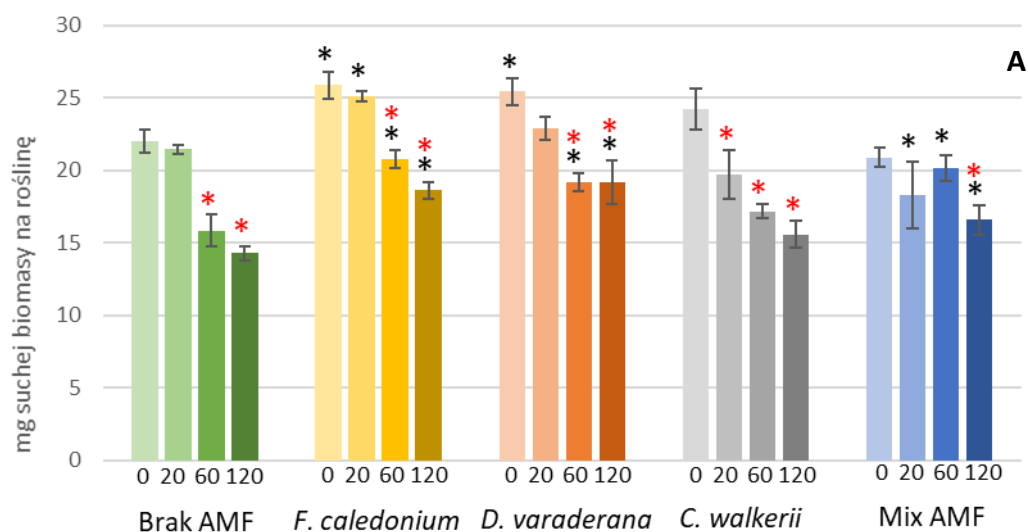
Mikoryza i skażenie miały bardzo istotny wpływ na biomasę korzeni (Tabela 15). Podobnie jak w przypadku części nadziemnych roślin, skażenie fenolem i PAH obniżyło biomasę korzeni. Porównując do niemikoryzowej kontroli, inokulacja *F. caledonium* zwiększyła biomasę korzeni roślin, ale tylko w przypadku nieskażonej gleby był to wzrost statystycznie istotny. Inokulacja *D. varaderana* nie spowodowała istotnych różnic, natomiast inokulacja *C. walkeri* oraz trzema gatunkami AMF znacznie obniżyła biomasę korzeni (Ryc. 40. B). W przypadku niemikoryzowej kontroli, stosunek biomasy korzeni do pędów był znacząco wyższy w kulturach skażonych fenolem i PAH, podczas gdy obecność mikoryzy odwróciła ten trend, stymulując rozwój pędów i redukując biomasę korzeni (Ryc. 41).

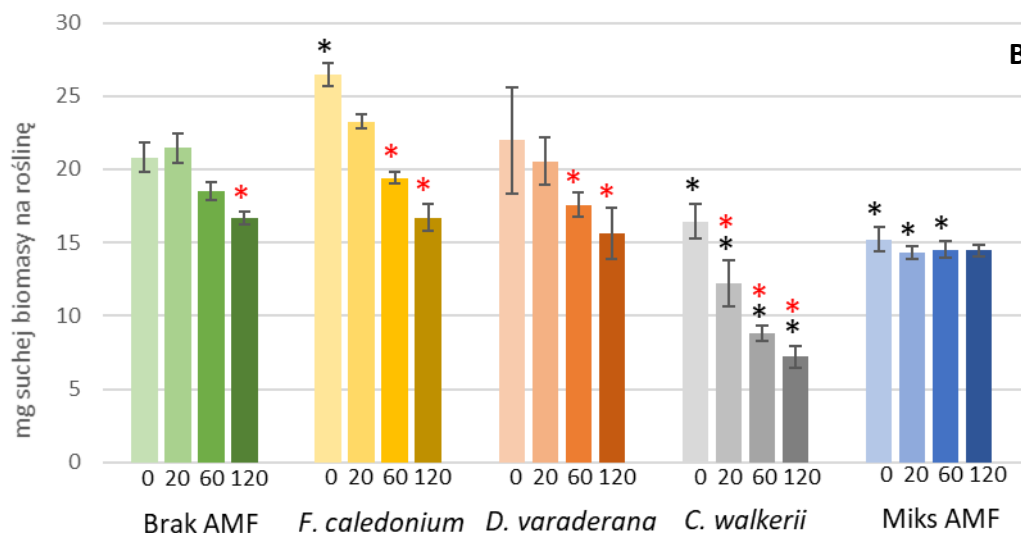


Ryc. 38. Kultury doniczkowe *L. perenne* rosnące w podłożu skażonym fenolem i PAH, inokulowane *D. varaderana*, *F. caledonium*, *C. walkeri* i wszystkimi trzema gatunkami AMF jednocześnie.

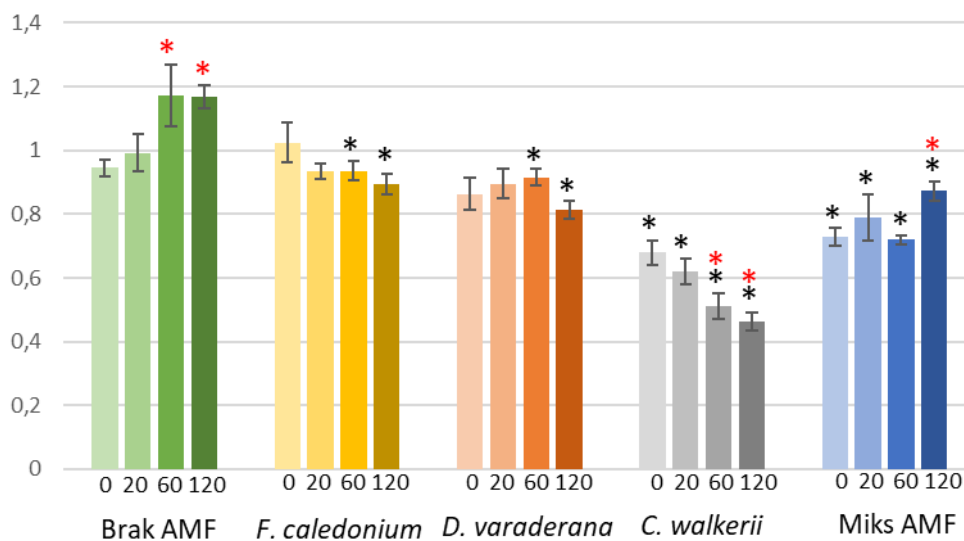


Ryc. 39. Wysokość pędów *L. perenne* w kulturach skażonych fenolem i PAH, inokulowanych AMF. Liczby 0, 20, 60 i 120 pod słupkami oznaczają poziomy skażenia: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹. Różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (dwuczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a) pomiędzy kulturami mikoryzowymi i niemikoryzową kontrolą oraz pomiędzy kulturami skażonymi i nieskażoną kontrolą oznaczono odpowiednio, czarnymi i czerwonymi gwiazdkami.





Ryc. 40. Biomasa pędów (A) i korzeni (B) *L. perenne* w kulturach skażonych fenolem i PAH, inokulowanych AMF. Liczby 0, 20, 60 i 120 pod słupkami oznaczają poszczególne skażenia: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹. Różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (dwuczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a) pomiędzy kulturami mikoryzowymi i niemikoryzową kontrolą, oraz pomiędzy kulturami skażonymi i nieskażoną kontrolą oznaczono odpowiednio, czarnymi i czerwonymi gwiazdkami.



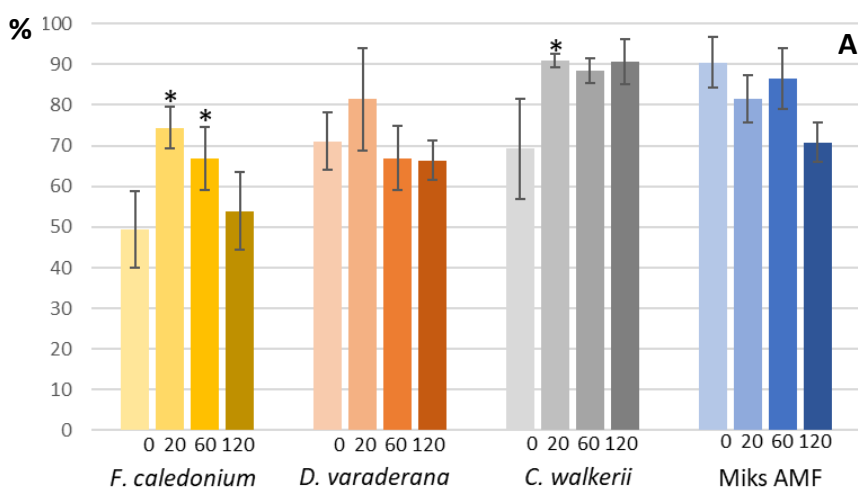
Ryc. 41. Stosunek biomasy korzeni do biomasy pędów *L. perenne* w kulturach skażonych fenolem i PAH, inokulowanych AMF. Liczby 0, 20, 60 i 120 pod słupkami oznaczają poziomy skażenia: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹. Różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (dwuczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a) pomiędzy kulturami mikoryzowymi i niemikoryzową kontrolą oraz pomiędzy kulturami skażonymi i nieskażoną kontrolą oznaczono odpowiednio, czarnymi i czerwonymi gwiazdkami.

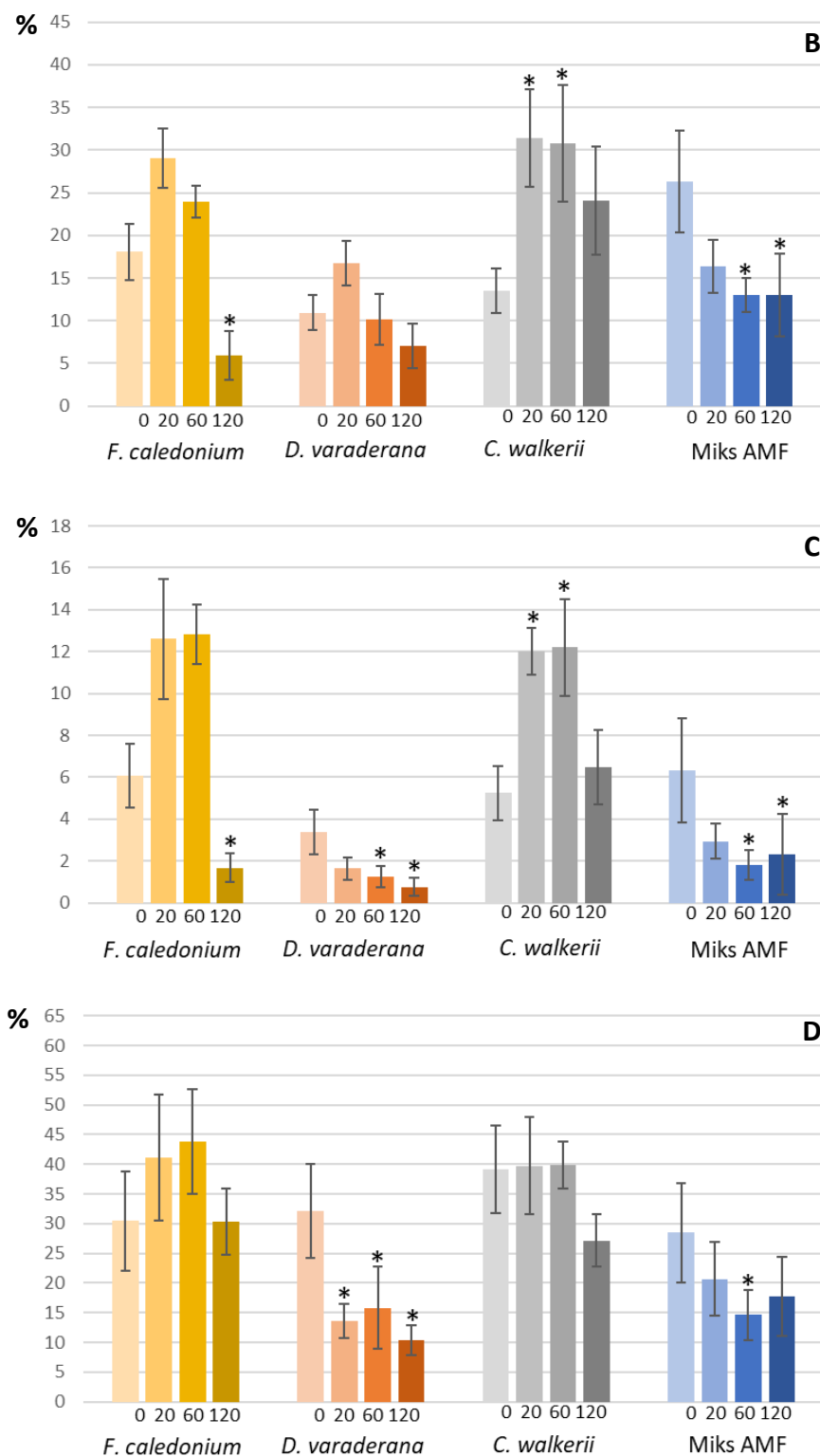
4.8.2. Kolonizacja mikoryzowa korzeni i wytwarzanie spor

Dwuczynnikowa ANOVA wykazała istotność wpływu zarówno inokulacji mikoryzowej, jak i stężenia fenolu i PAH w podłożu na kolonizację mikoryzową korzeni roślin, wskazując na interakcję pomiędzy oboma czynnikami (Tabela 16). Niskie i średnie poziomy skażenia fenolem i PAH stymulowały częstość (F%) i intensywność kolonizacji mikoryzowej korzeni (M%) przez *F. caledonium* i *C. walkeri* oraz rozwój arbuskul (A%, a%). Najwyższe stężenie fenolu i PAH w podłożu wywarło natomiast efekt toksyczny, znacznie obniżając wartości parametrów kolonizacji, w stosunku do nieskażonej kontroli. W przypadku inokulacji *D. varaderana* i trzema gatunkami AMF, negatywny wpływ fenolu i PAH na kolonizację mikoryzową, a w szczególności na ilość arbuskul, obserwowano już przy najniższym stopniu skażenia (Ryc. 42. A, B, C, D).

Tabela 16. Wpływ inokulacji mikoryzowej oraz zanieczyszczenia fenolem i PAH na kolonizację mikoryzową korzeni i wytwarzanie spor przez AMF (dwuczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$).

Dwuczynnikowa ANOVA	P - czynniki			Wariancja wyjaśniona (%)		
	AMF	Fenol/PAH	AMF × fenol/PAH	AMF	Fenol/ PAH	AMF × fenol/PAH
PARAMETRY KOLONIZACJI KORZENI I LICZBA SPOR AMF						
M%	< 0,001	< 0,001	< 0,001	68,03	21,13	10,84
F%	< 0,001	< 0,001	< 0,001	41,64	41,06	17,30
A%	< 0,001	< 0,001	< 0,001	67,74	23,22	9,04
L. spor, kultury jednogatunkowe	< 0,001	< 0,001	< 0,001	87,67	7,51	4,82
L. spor, kultury trójgatunkowe	< 0,001	< 0,001	< 0,001	63,40	22,76	13,84





Ryc. 42. Parametry kolonizacji mikoryzowej korzeni *L. perenne* w kulturach skażonych fenolem i PAH, inokulowanych AMF: częstość występowania mikoryzy w systemie korzeniowym (A), intensywność kolonizacji systemu korzeniowego (B), liczba arbuskul w systemie korzeniowym (C), liczba arbuskul w mikoryzowych odcinkach korzeni (D). Liczby 0, 20, 60 i 120 pod słupkami oznaczają poziomy skażenia: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹. Różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (dwuczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a) pomiędzy próbkami skażonymi i nieskażoną kontrolą oznaczono czarnymi gwiazdkami.

Ilość spor wytwarzanych przez AMF zależała zarówno od gatunku AMF, jak i poziomu skażenia podłoża (Tabela 16). *C. walkeri* wytwarzał wielokrotnie więcej spor, w porównaniu do *F. caledonium* i *D. varaderana*. W czystych kulturach AMF, skażenie nie miało wpływu na wytwarzanie spor przez *F. caledonium*, jednakże obniżyło sporulację u *D. varaderana* i *C. walkeri*. W nieskażonych kulturach zawierających trójgatunkowe inokulum mikoryzowe obserwowano bardzo intensywną, nadmierną produkcję spor przez *C. walkeri*, umiarkowaną produkcję spor przez *F. caledonium* oraz zupełny brak spor należących do *D. varaderana* (Tabela 17). Obecność fenolu i PAH w podłożu ograniczyła ekstensywną produkcję spor przez *C. walkeri*, osłabiając również produkcję spor przez *F. caledonium*. W kulturach skażonych zaobserwowano natomiast nieliczne spory *D. varaderana* (Tabela 17).

Tabela 17. Liczba spor AMF w kulturach *L. perenne* skażonych fenolem i PAH.

mg fenolu/PAH kg ⁻¹	Gatunek AMF		
	<i>F. caledonium</i>	<i>D. varaderana</i>	<i>C. walkeri</i>
	Jednogatunkowe inokulum mikoryzowe (średnia ± SD)		
0/0	52 ± 15	125 ± 42	551 ± 103
5/20	67 ± 11	33 ± 8*	322 ± 105
15/60	73 ± 18	38 ± 6*	184 ± 57*
30/120	62 ± 9	39 ± 10*	186 ± 43*
	Trójgatunkowe inokulum mikoryzowe (średnia ± SD)		
0/0	106 ± 40	0	1479 ± 708
5/20	23 ± 13	37 ± 28*	484 ± 84
15/60	12 ± 3*	0	45 ± 26*
30/120	16 ± 4*	8 ± 11	8 ± 7*

*wartości różniące się istotnie od wartości dla nieskażonej kontroli (dwuczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a, $P < 0,05$)

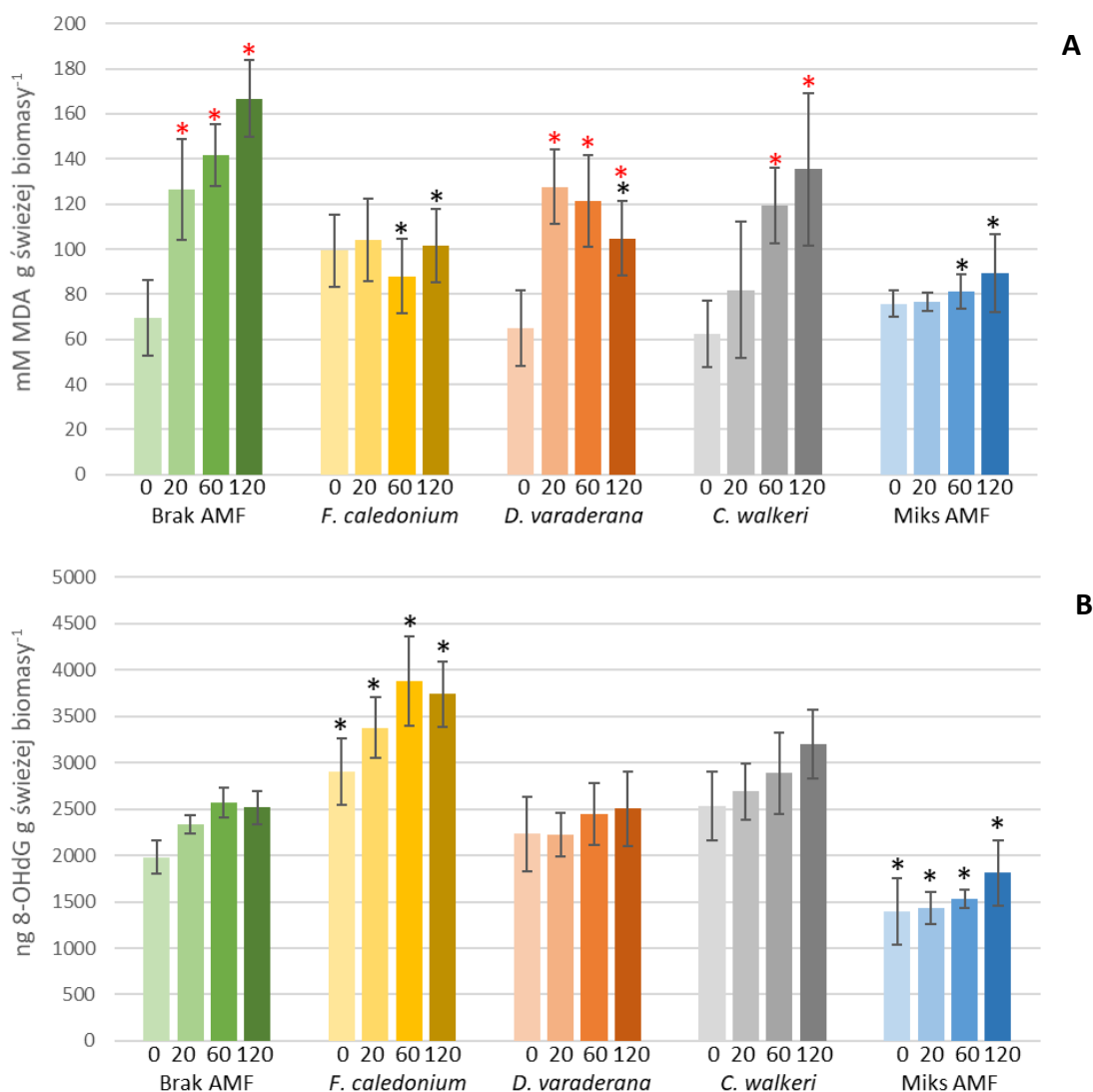
4.8.3. Poziom stresu oksydacyjnego w tkankach roślinnych

Dwuczynnikowa analiza ANOVA wskazała na istotny wpływ skażenia fenolem i PAH oraz inokulacji mikoryzowej na poziom peroksydacji lipidów w pędach *L. perenne*, wskazując na interakcję pomiędzy tymi czynnikami (Tabela 18). Poziom peroksydacji lipidów zwiększał się wraz ze stężeniem fenolu i PAH w podłożu; jednakże, inokulacja mikoryzowa istotnie obniżyła peroksydację lipidów w kulturach skażonych średnimi i wysokimi stężeniami fenolu i PAH. Stopień peroksydacji lipidów był najniższy w roślinach inokulowanych *F. caledonium* i trzema gatunkami AMF (Ryc. 43. A).

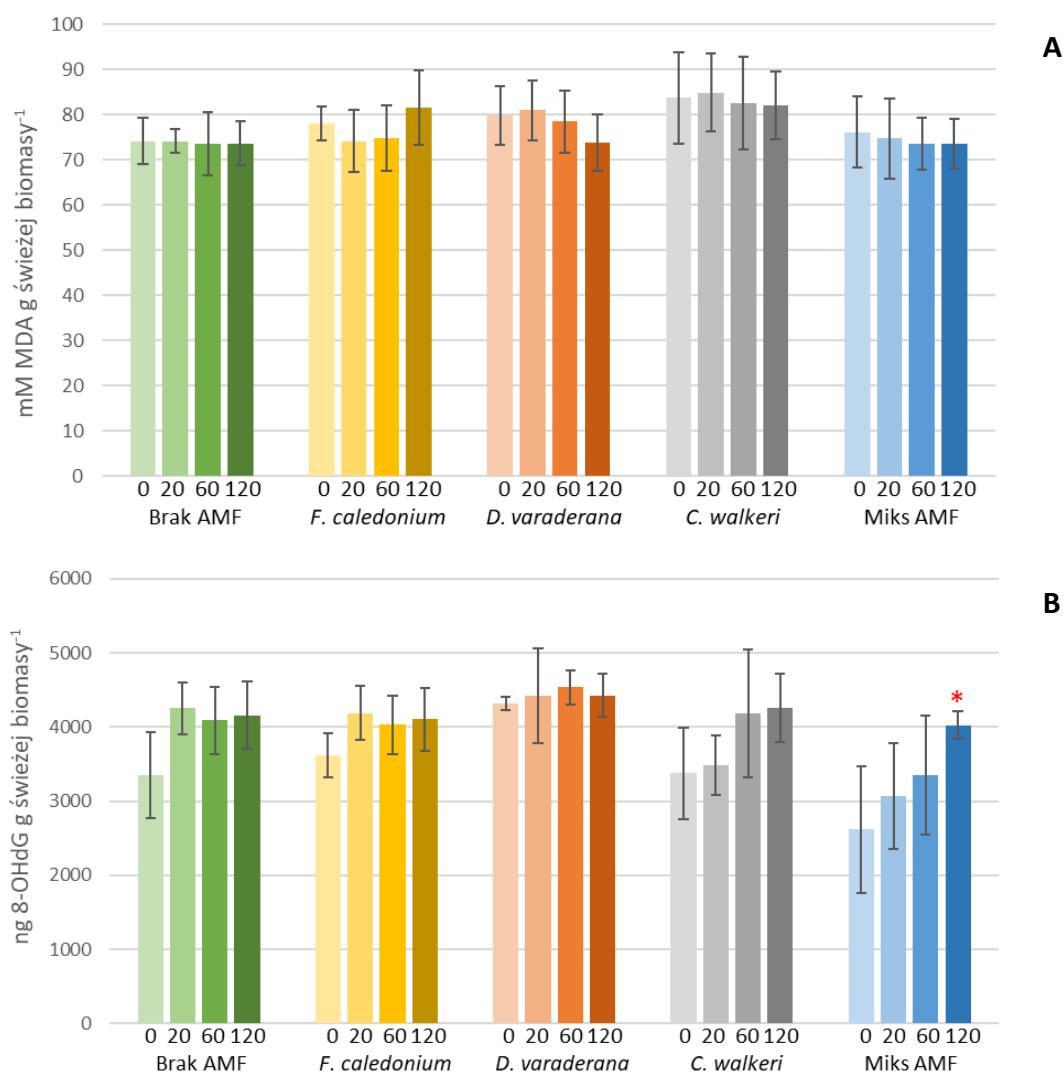
Analiza ANOVA wskazała na inokulację mikoryzową jako najbardziej istotny czynnik wpływający na oksydację DNA w pędach *L. perenne* (Tabela 18). W przeciwieństwie do poziomu peroksydacji lipidów, stężenie 8-OHdG było najwyższe w pędach roślin inokulowanych *F. caledonium*. W pędach roślin inokulowanych trzema gatunkami AMF poziom oksydacji DNA był niższy, w porównaniu do niemikoryzowej kontroli. Inokulacja *D. varaderana* i *C. walkeri* nie wywarła istotnego wpływu na wartość stężenia 8-OHdG w pędach (Ryc. 43. B). Zarówno poziom skażenia, jak i inokulacja mikoryzowa nie miały istotnego wpływu na poziomy peroksydacji lipidów i oksydacji DNA w tkankach korzeni (Tabela 18; Ryc. 44. A, B).

Tabela 18. Wpływ inokulacji mikoryzowej oraz zanieczyszczenia fenolem i PAH na parametry stresu oksydacyjnego w roślinach (dwuczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$).

Dwuczynnikowa ANOVA	<i>P</i> – czynniki			Wariancja wyjaśniona (%)		
	AMF	Fenol/ PAH	AMF × fenol/PAH	AMF	Fenol/ PAH	AMF × fenol/PAH
WSKAŹNIKI STRESU OKSYDACYJNEGO W TKANKACH ROŚLINNYCH						
Peroksydacja lipidów w pędach	< 0,001	< 0,001	< 0,001	26,14	55,03	18,83
Peroksydacja lipidów w korzeniach	0,004	0,832	0,939	85,71	5,19	9,09
Oksydacja DNA w pędach	< 0,001	< 0,001	0,754	82,79	11,09	0,61
Oksydacja DNA w korzeniach	< 0,001	< 0,001	0,354	54,88	39,02	6,10



Ryc. 43. Poziom peroksydacji lipidów **(A)** i oksydacji DNA **(B)** w pędach *L. perenne* w kulturach skażonych fenolem i PAH, inokulowanych AMF. Liczby 0, 20, 60 i 120 pod słupkami oznaczają poziomy skażenia: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹. Różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (dwuczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a), pomiędzy kulturami mikoryzowymi i niemikoryzową kontrolą oraz pomiędzy kulturami skażonymi i nieskażoną kontrolą oznaczono odpowiednio, czarnymi i czerwonymi gwiazdkami.



Ryc. 44. Poziom peroksydacji lipidów (**A**) i oksydacji DNA (**B**) w korzeniach *L. perenne* w kulturach skażonych fenolem i PAH, inokulowanych AMF. Liczby 0, 20, 60 i 120 pod słupkami oznaczają poziomy skażenia: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹. Różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (dwuczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a), pomiędzy kulturami mikoryzowymi i niemikoryzową kontrolą oraz pomiędzy kulturami skażonymi i nieskażoną kontrolą oznaczono odpowiednio, czarnymi i czerwonymi gwiazdkami.

4.8.4. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkankach roślinnych

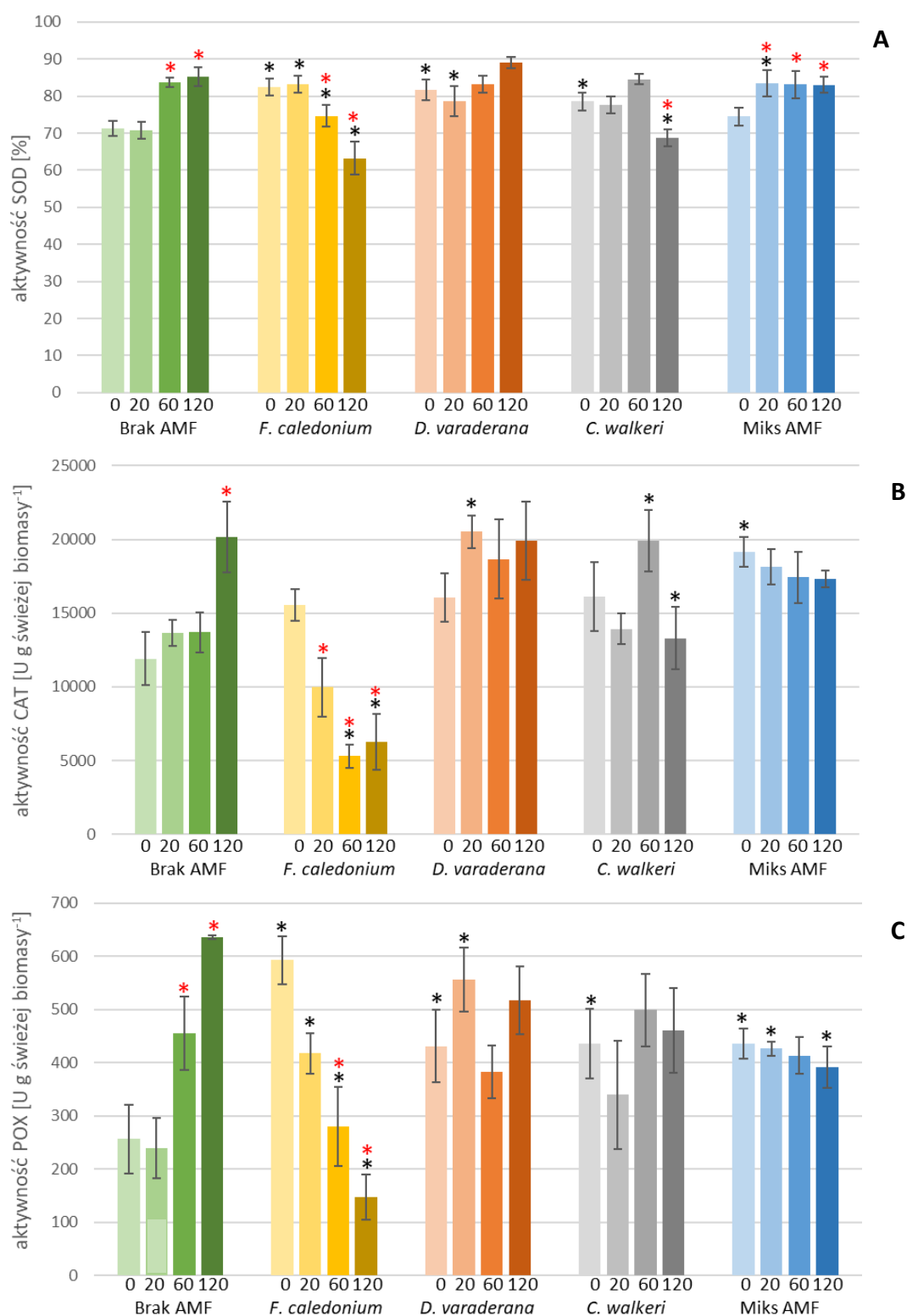
Dwuczynnikowa analiza ANOVA wykazała, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych w pędach *L. perenne* zależała zarówno od poziomu skażenia, jak i inokulacji mikoryzowej, wskazując na interakcję pomiędzy tymi czynnikami (Tabela 19). W roślinach nie inokulowanych AMF obserwowano wzrost aktywności SOD, CAT i POX w pędach, wraz ze wzrostem koncentracji fenolu i PAH w podłożu. U roślin hodowanych

w podłożu bez fenolu i PAH oraz w podłożu o niskim stopniu skażenia, obecność mikoryzy, bez względu na gatunek AMF, spowodowała wzrost aktywności enzymatycznej, w porównaniu do niemikoryzowej kontroli. Przy średnim poziomie skażenia nie obserwowano istotnego wpływu inokulacji mikoryzowej na aktywność SOD, CAT i POX; natomiast, przy wysokim poziomie skażenia podłoża, inokulacja AMF, a w szczególności *F. caledonium*, spowodowała obniżenie aktywności enzymatycznej w pędach, w porównaniu do roślin niemikoryzowych (Ryc. 45. A, B, C).

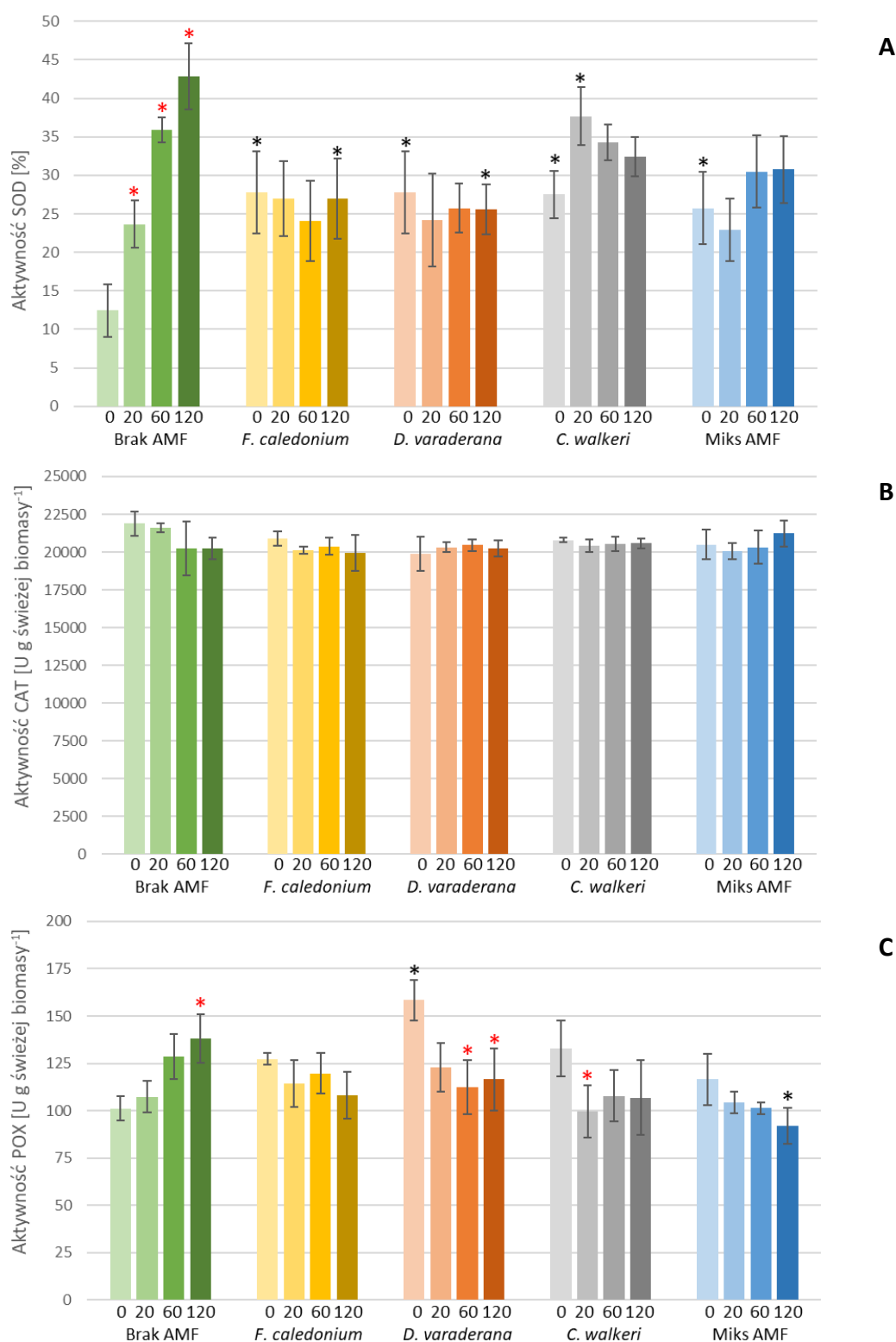
Poziom skażenia oraz inokulacja mikoryzowa miała również wpływ na aktywność SOD i POX w korzeniach, podczas gdy aktywność CAT była na stałym poziomie we wszystkich próbach (Tabela 19). Podobnie jak w przypadku pędów, wzrost koncentracji fenolu i PAH spowodował wzrost aktywności SOD i POX w korzeniach. W korzeniach roślin zaszczerpionych mikoryzą, w hodowlach nieskażonych, aktywność enzymatyczna została podwyższona; natomiast, w hodowlach skażonych 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹ obserwowano spadek aktywności enzymatycznej w stosunku do kultur niemikoryzowych (Ryc. 46. A, B, C).

Tabela 19. Wpływ inokulacji mikoryzowej oraz zanieczyszczenia fenolem i PAH na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w roślinach (dwuczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$).

Dwuczynnikowa ANOVA	P - czynniki			Wariancja wyjaśniona (%)		
	AMF	Fenol/PAH	AMF × fenol/PAH	AMF	Fenol/PAH	AMF × fenol/PAH
AKTYWNOŚĆ ENZYMÓW ANTYOKSYDACYJNYCH w TKANKACH ROŚLINNYCH						
SOD w pędach	< 0,001	< 0,001	< 0,001	32,86	18,57	48,57
SOD w korzeniach	< 0,001	< 0,001	< 0,001	21,40	44,96	33,64
CAT w pędach	< 0,001	0,185	< 0,001	80,32	3,70	15,97
CAT w korzeniach	0,083	0,380	0,059	-	-	-
POX w pędach	< 0,001	0,375	< 0,001	35,68	2,90	61,42
POX w korzeniach	< 0,001	< 0,001	< 0,001	37,30	37,98	24,72



Ryc. 45. Aktywność SOD (A), CAT (B) i POX (C) w pędach *L. perenne* w kulturach skażonych fenolem i PAH, inokulowanych AMF. Liczby 0, 20, 60 i 120 pod słupkami oznaczają poziomy skażenia: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹. Różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (dwuczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a) pomiędzy kulturami mikoryzowymi i niemikoryzową kontrolą oraz pomiędzy kulturami skażonymi i nieskażoną kontrolą oznaczono odpowiednio, czarnymi i czerwonymi gwiazdkami.



Ryc. 46. Aktywność SOD (**A**), CAT (**B**) i POX (**C**) w korzeniach *L. perenne* w kulturach skażonych fenolem i PAH, inokulowanych AMF. Liczby 0, 20, 60 i 120 pod słupkami oznaczają poziomy skażenia: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹. Różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (dwuczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a) pomiędzy kulturami mikoryzowymi i niemikoryzową kontrolą oraz pomiędzy kulturami skażonymi i nieskażoną kontrolą, oznaczono odpowiednio, czarnymi i czerwonymi gwiazdkami.

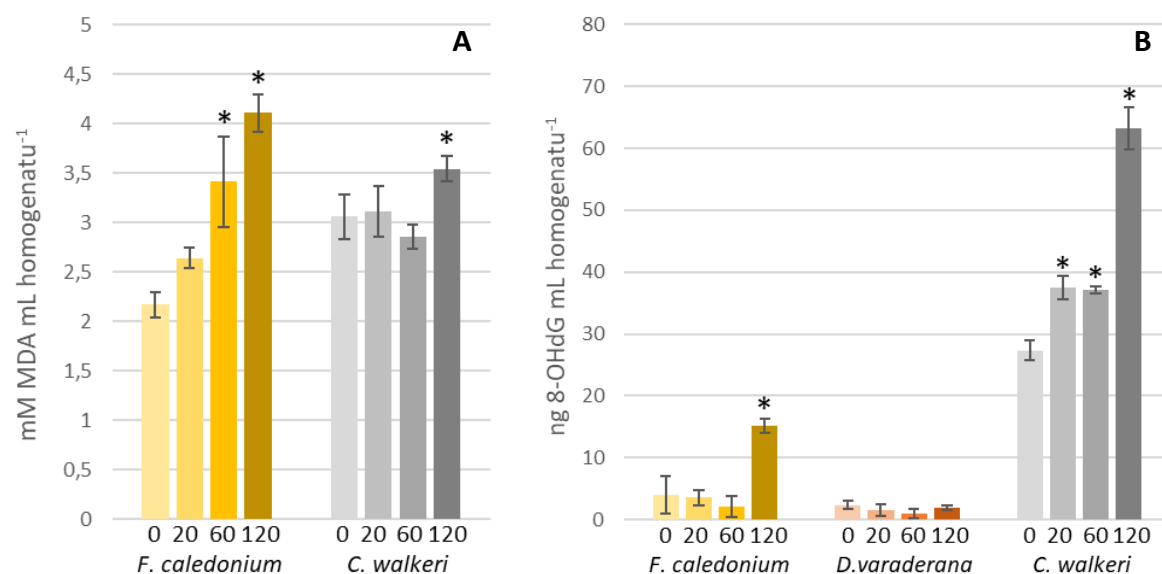
4.8.5. Poziom stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych w sporach AMF

Jednoczynnikowa analiza wariancji wskazała na istotny wpływ stężenia fenolu i PAH w podłożu na wzrost poziomu peroksydacji lipidów i oksydacji DNA w sporach *F. caledonium* i *C. walkeri*. W przypadku spor *D. varaderana* nie obserwowano żadnego efektu skażenia na poziom oksydacji DNA. Ze względu na niewystarczającą ilość homogenatu, nie przeprowadzono dla tego gatunku oznaczenia poziomu peroksydacji lipidów (Tabela 20; Ryc. 47. A, B).

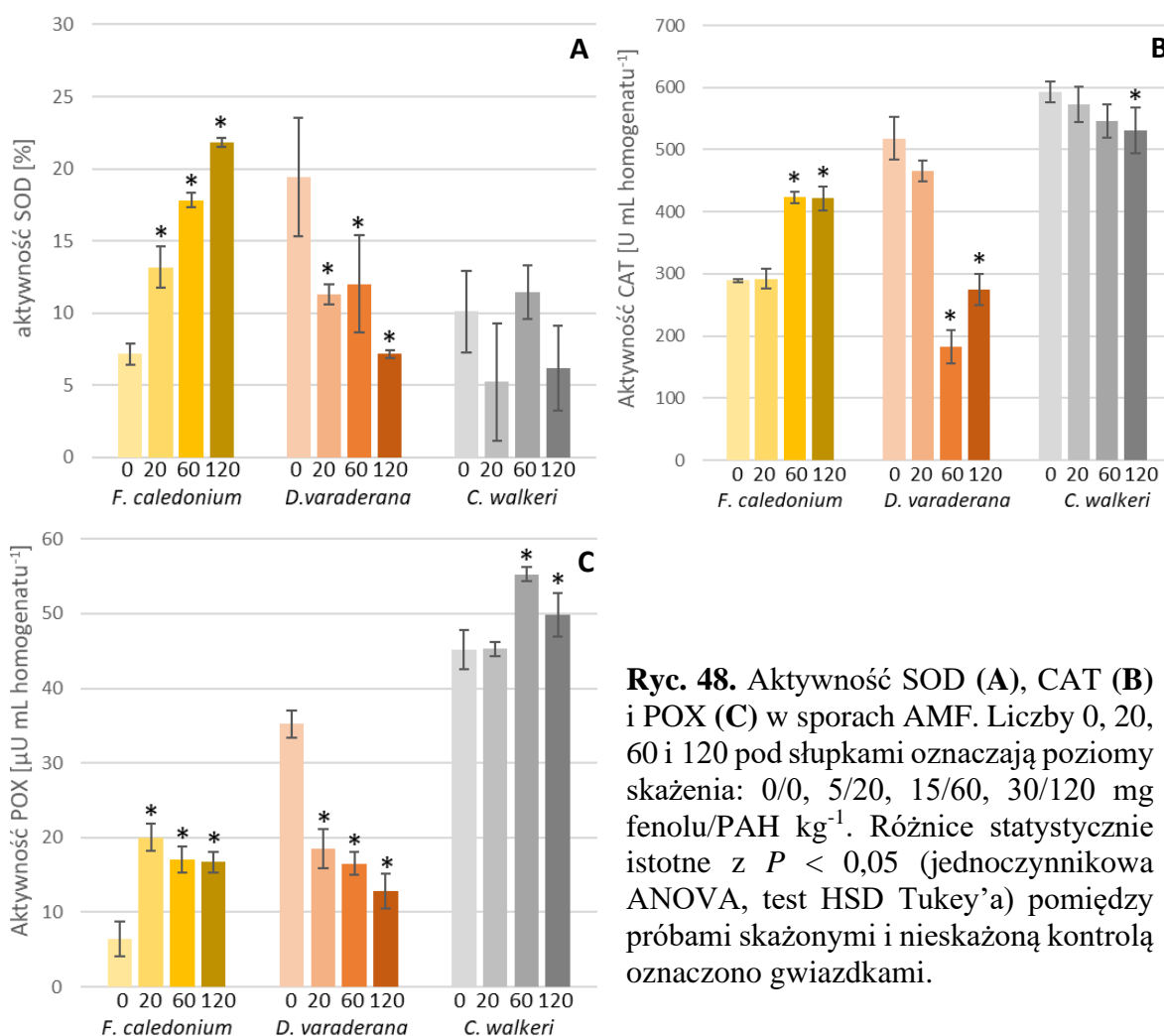
Zmiany aktywności antyoksydacyjnej w sporach AMF w odpowiedzi na wzrost skażenia podłoża fenolem i PAH, były bardzo zróżnicowane pomiędzy badanymi gatunkami. W przypadku *F. caledonium* doszło do silnego wzrostu aktywności SOD, CAT i POX w skażonych kulturach, podczas gdy w sporach *D. varaderana* obserwowano spadek aktywności tych enzymów. Aktywności SOD, CAT i POX w sporach *C. walkeri* nie wykazywały żadnej wyraźnej tendencji spadkowej bądź wzrostowej w odpowiedzi na rosnący poziom skażenia (Tabela 20, Ryc. 48. A, B, C).

Tabela 20. Wpływ zanieczyszczenia fenolem i PAH na parametry stresu oksydacyjnego i aktywność enzymów antyoksydacyjnych w sporach AMF (jednoczynnikowa ANOVA, $P < 0,05$).

Jednoczynnikowa ANOVA	<i>P</i> – fenol/PAH		
	<i>C. caledonium</i>	<i>D. varaderana</i>	<i>C. walkeri</i>
Peroksydacja lipidów	< 0,001	bd.	< 0,001
Oksydacja DNA	< 0,001	< 0,001	< 0,001
SOD	< 0,001	< 0,001	< 0,001
CAT	< 0,001	< 0,001	< 0,001
POX	< 0,001	< 0,001	< 0,001



Ryc. 47. Poziom peroksydacji lipidów (A) i oksydacji DNA (B) w sporach AMF. Liczby 0, 20, 60 i 120 pod słupkami oznaczają poziomy skażenia: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹. Różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a) pomiędzy próbkami skażonymi i nieskażoną kontrolą oznaczono gwiazdkami.



Ryc. 48. Aktywność SOD (A), CAT (B) i POX (C) w sporach AMF. Liczby 0, 20, 60 i 120 pod słupkami oznaczają poziomy skażenia: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹. Różnice statystycznie istotne z $P < 0,05$ (jednoczynnikowa ANOVA, test HSD Tukey'a) pomiędzy próbkami skażonymi i nieskażoną kontrolą oznaczono gwiazdkami.

5. Dyskusja

5.1. Wpływ zanieczyszczenia fenolem i PAH na biomasę i bioróżnorodność AMF

W niniejszej pracy, po raz pierwszy zaprezentowano badania nad społecznościami AMF w środowisku zanieczyszczonym mieszkanką fenolu i PAH. W związku z tym, że w literaturze światowej brakuje publikacji dotyczących różnorodności AMF w tak zanieczyszczonych środowiskach, uzyskane wyniki skonfrontowano z badaniami nad bioróżnorodnością społeczności AMF w środowiskach zanieczyszczonych ropą naftową i związkami ropopochodnymi, które również zawierają znaczącą frakcję PAH.

5.1.2. Rozwój AMF w glebie i w korzeniach

Potwierdzając postawioną hipotezę, zanieczyszczenie gleby fenolem i PAH miało negatywny wpływ na kolonizację mikoryzową korzeni obu badanych gatunków roślin. Bardzo niska liczba arbuskul sugerowała osłabienie wymiany składników odżywczych pomiędzy grzybem i gospodarzem roślinnym. Podobne wyniki uzyskano badając kolonizację mikoryzową roślin rosnących w glebach zanieczyszczonych węglowodorami, w różnych szerokościach geograficznych: Amazonii (Garcés-Ruiz i wsp., 2017), Kanadzie (Iffis i wsp., 2016), Meksyku (Franco-Ramírez i wsp., 2007), Argentynie i Niemczech (Cabello, 1997). We wszystkich tych badaniach stwierdzono słabą kolonizację mikoryzową i małą liczbę arbuskul, w porównaniu do stanowisk o niskim stopniu zanieczyszczenia węglowodorami lub niezanieczyszczonych. Niekorzystny wpływ PAH na kolonizację mikoryzową korzeni obserwowano również *in vitro*, w kulturach korzeni włośnikowatych. Pomimo słabego rozwoju mikoryzy, skolonizowane korzenie wykazały lepszy wzrost i niższy poziom stresu oksydacyjnego, w porównaniu do niemikoryzowej kontroli (Debiane i wsp., 2008, 2009; Aranda i wsp., 2013; Calonne i wsp., 2014b).

Ponadto, w korzeniach roślin zebranych z terenu kontrolnego odnotowano obecność obu typów morfologicznych mikoryzy, *Arum* i *Paris*, podczas gdy na terenie zanieczyszczonym występował tylko typ *Arum*. Obecność obu typów mikoryzy sugerowała większą bioróżnorodność AMF, zarówno gatunkową, jak i funkcjonalną, na terenie kontrolnym. Występowanie typu *Arum* na terenie zanieczyszczonym mogło wynikać

z dominacji AMF z rodziny *Glomeraceae* w badanych społecznościach (Pandey i Garg, 2017).

Wiele eksperymentów prowadzonych w warunkach polowych oraz *in vitro* wykazało, iż poza osłabioną kolonizacją mikoryzową korzeni, obecność węglowodorów skutkuje słabszym wzrostem ERM i mniejszą produkcją spor (Franco-Ramírez i wsp., 2007; Debiane i wsp., 2008, 2009; Aranda i wsp., 2013; Nwoko, 2014). Stwierdzono, że przyczyną osłabienia wzrostu AMF mogą być zaburzenia metaboliczne w obrębie ERM i IRM. Przejawiają się one obniżeniem biosyntezy steroli i fosfolipidów (Calonne i wsp., 2014a), spadkiem aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (Gaspar i wsp., 2002) i spadkiem wydajności transportu fosforu (Calonne i wsp., 2014b). W niniejszych badaniach, zawartości GRSP i 16 ω 5c NLFA, wykazały negatywną korelację ze stężeniem fenolu i PAH, potwierdzając niekorzystny wpływ zanieczyszczeń na rozwój AMF w glebie okołokorzeniowej. W przeciwieństwie do danych literaturowych, prezentowane badania wykazały nawet dwukrotnie wyższą ilość spor i długość mycelium w glebie zanieczyszczonej, w porównaniu do gleby niezanieczyszczonej. Jednakże, dalsze obserwacje wykazały, iż większość spor wyizolowanych z gleby zanieczyszczonej była stara, martwa lub uszkodzona. Potwierdziła to niska zawartość 16 ω 5c NLFA i EE-GRSP w glebie zanieczyszczonej. Kwas tłuszczowy 16 ω 5c występuje w dużych ilościach w żywych sporach, bogatych w lipidy, natomiast EE-GRSP są wydzielane przez żywe, aktywne metabolicznie mycelium AMF (Bedini i wsp., 2007; Vestberg i wsp., 2012; Wu i wsp. 2014). Zatem, wyniki te pokazują, że ilość spor i długość ERM nie zawsze są wiarygodnym wskaźnikiem biomasy AMF w glebie.

5.1.3. Bioróżnorodność społeczności AMF

5.1.3.1. Wybór odpowiedniego markera genetycznego

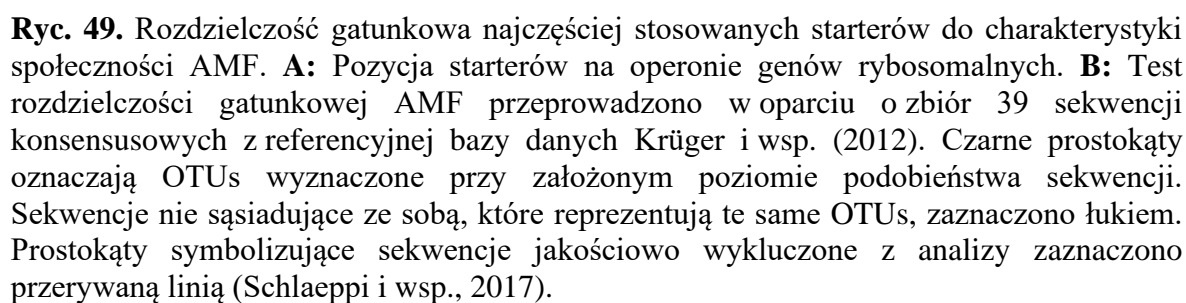
Badanie bioróżnorodności społeczności AMF przeprowadzono dwoma technikami, DGGE oraz NGS. DGGE jest metodą od lat stosowaną do oceny różnorodności AMF, jednak cechuje się ona relatywnie niską rozdzielczością gatunkową i specyficznością (Ma i wsp., 2005; Wang i wsp., 2015). NGS pozwala uzyskać nieporównywalnie większą liczbę sekwencji ze znacznym pokryciem gatunkowym, umożliwiając dokładniejszą charakterystykę społeczności mikroorganizmów. Ponadto, dzięki obróbce bioinformatycznej, możliwa jest eliminacja sekwencji niespecyficznych i zawierających

błędy z analizowanego zbioru danych. Jednakże, w przypadku badań różnorodności społeczności AMF, trudno jest opracować metodę, która dawałaby jednocześnie satysfakcjonującą rozdzielczość gatunkową i pokrycie gatunkowe AMF w próbach środowiskowych. Wynika to z wysokiej wewnątrzgatunkowej zmienności AMF na poziomie genetycznym, co stwarza problemy ze znalezieniem odpowiedniego markera molekularnego, opartego na krótkiej, kilkusetnukleotydowej sekwencji rDNA (Crossay i wsp., 2017). Dotychczas, opracowano wiele par starterów specyficznych dla AMF, opartych zarówno na sekwencjach genów SSU rDNA, ITS oraz LSU rDNA. Jednakże, nadal nie wyeliminowano problemów z rozróżnieniem blisko spokrewnionych gatunków AMF, dyskryminacją niektórych linii taksonomicznych AMF oraz z niespecyficzną amplifikacją DNA organizmów spoza podgromady *Glomeromycotina*. Kolejnym problemem jest ograniczona reprezentatywność uzyskanych sekwencji w dostępnych bazach danych (Stockinger i wsp., 2010; Schoch i wsp., 2012). W celu rozróżnienia blisko spokrewnionych gatunków AMF, Krüger i wsp. (2009) opracowali marker genetyczny, który obejmuje zarówno fragment genu SSU rDNA, region ITS, oraz fragment genu LSU rDNA (Ryc. 49). Na jego podstawie, stworzono bogatą referencyjną bazę danych sekwencji rDNA *Glomeromycotina* (<http://www.amf-phylogeny.com>), zidentyfikowano wiele nowych gatunków i zaktualizowano drzewo filogenetyczne AMF. Niestety, sekwencja SSU rDNA – ITS – LSU rDNA stanowi fragment DNA o wielkości > 1500 pz, co ogranicza jej zastosowanie w komercyjnym NGS opartym na technologii Illumina, w której sekwencjonuje się krótkie markery genetyczne, o maksymalnej długości 500 pz (Ravi i wsp., 2018).

Złotym standardem w identyfikacji gatunkowej grzybów jest region ITS (Schoch i wsp., 2012). Jednakże, zastosowanie uniwersalnych starterów ITS dla grzybów, daje niewielkie pokrycie podgromady *Glomeromycotina* w puli DNA środowiskowego zdominowanej przez *Ascomycota* i *Basidiomycota* (Schlaeppli i wsp., 2016). Wśród *Glomeromycotina*, region ITS charakteryzuje bardzo duża zmienność, co nadaje mu duży potencjał dyskryminacyjny na poziomie gatunku. Wymaga to jednak zastosowania osobnego zestawu starterów specyficznego dla każdej rodziny w obrębie *Glomeromycotina* (Ryc. 49) (Redecker i wsp., 2003; Stockinger i wsp., 2010). Wykazano, że startery oparte o region ITS powodują nadmierną amplifikację sekwencji należących do rodzin AMF, które w rzeczywistości są rzadziej reprezentowane w badanym środowisku, zubażając jednocześnie pulę sekwencji rodzin dominujących (Kohout i wsp., 2014).

Gen SSU rDNA charakteryzuje mniejsza zmienność, w porównaniu do regionu ITS, umożliwiając zaprojektowanie pojedynczej pary starterów specyficznych wobec *Glomeromycotina*. W związku z tym, gen SSU rDNA jest najczęściej wybieranym markerem genetycznym do charakterystyki społeczności AMF. Startery oparte na jego sekwencji, po bezpośredniej amplifikacji na matrycy DNA środowiskowego, dają krótki produkt, zatem są technicznie najbardziej kompatybilne z systemami NGS. Ponadto, referencyjna baza danych sekwencji genu SSU rDNA *Glomeromycotina* nie jest na tyle aktualna i dokładna jak baza danych oparta na markerze SSU rDNA – ITS – LSU rDNA (Öpik i wsp., 2010). Niestety, fragmenty genu SSU rDNA amplifikowane z użyciem dostępnych starterów, nie pokrywają się z fragmentem tego genu wchodzącym w skład markera molekularnego SSU rDNA – ITS – LSU rDNA (Kohout i wsp., 2014). Ponadto, sekwencja genu SSU rDNA nie gwarantuje rozróżnienia gatunków AMF o bardzo bliskim pokrewieństwie, a startery na niej oparte cechuje bardzo silna specyficzność względem sekwencji AMF z rodziny *Glomeraceae*. Skutkiem tego, jest zawyżona reprezentatywność rodziny *Glomeraceae* i zaniżona reprezentatywność innych rodzin w obrębie społeczności AMF (Ryc. 49) (Rosendahl, 2008; Lumini i wsp., 2010; Kohout i wsp., 2014).

Region D2 genu LSU rDNA cechuje podobnie wysoka rozdzielczość gatunkowa do regionu ITS. Jednakże, startery oparte na sekwencji genu LSU rDNA, specyficzne wobec *Glomeromycotina*, nie gwarantują odpowiedniego pokrycia gatunkowego i reprezentatywności wszystkich rodzin w społecznościach AMF. Ponadto, brak odpowiedniej referencyjnej bazy danych sekwencji AMF utrudnia zastosowanie tego fragmentu w NGS (Ryc. 49) (Kohout i wsp., 2014; Schlaeppi i wsp., 2017). Na potrzeby niniejszego projektu badawczego, zaprojektowano nowe startery oparte o region D2 genu LSU rDNA. Korzystając z sekwencji SSU rDNA – ITS – LSU rDNA dostępnych w bazie danych NCBI, skonstruowano referencyjną bazę danych sekwencji genu LSU rDNA odpowiednią do analizy sekwencji uzyskanych metodą NGS. Kosztem specyficzności, zaprojektowano zestaw starterów, który pomimo amplifikacji innych, bliższych filogenetycznie gromad, gwarantuje całkowite pokrycie gromady *Glomeromycotina*. Wyodrębnienie frakcji bogatej w amplikony AMF-specyficzne oparto na prostym rozwiązaniu, rozdzielając produkty PCR w żelu agarozowym i różnicując je na podstawie wielkości prążków.



5.1.3.2. Charakterystyka społeczności AMF w oparciu o metody DGGE i NGS

Obie zastosowane techniki, DGGE oraz NGS wykazały, że zanieczyszczenie gleby fenolem i PAH było głównym czynnikiem istotnie ograniczającym bioróżnorodność AMF w glebie i w korzeniach, potwierdzając założoną hipotezę badawczą. Uzyskane profile DGGE wskazały na występowanie większego bogactwa gatunkowego AMF na terenie niezanieczyszczonym, z którego uzyskano średnio 45 prążków w żelu na profil, podczas gdy z gleby zanieczyszczonej mniej niż 40 prążków. Wyniki sekwencjonowania DNA wyizolowanego z prążków oraz dane literaturowe wskazują jednak, że założenie “1 prążek = 1 jednostka taksonomiczna” wiąże się z przeszacowaniem bioróżnorodności AMF (Neilson i wsp., 2013). Wyniki sekwencjonowania o wysokiej przepustowości, zaprezentowane w niniejszej pracy i w innych publikacjach naukowych wskazują, że na terenach zanieczyszczonych węglowodorami wykrywano maksymalnie 20 – 30 OTUs AMF (Hassan i wsp., 2014; la Providencia i wsp., 2015; Iffis i wsp., 2016; Garcés-Ruiz i wsp., 2017, 2019). W społecznościach AMF w glebie wokół zanieczyszczonego stawu Kalina całkowita liczba MOTUs wyniosła 128 (średnio 5 – 24 MOTUs w jednej społeczności), podczas gdy na obszarze niezanieczyszczonego stawu Kokotek, 193 MOTUs (średnio 49 – 52 MOTUs w jednej społeczności). Hassan i wsp. (2014) obserwowali 17 – 19 OTUs w ryzosferze wierzby, rosnącej w glebie zanieczyszczonej węglowodorami i 24 OTUs w glebie niezanieczyszczonej. Z kolei, inne doniesienia nie wykazały istotnego wpływu węglowodorów na α -bioróżnorodność społeczności AMF. Zbliżone wartości indeksu Shannona, bez względu na poziom zanieczyszczenia gleby, odnotowano w badaniach prowadzonych na terenie byłego pola naftowego w Amazonii i na terenie osadników petrochemicznych w Kanadzie (Iffis i wsp., 2016; Garcés-Ruiz i wsp., 2017, 2019).

Metoda DGGE oparta na analizie sekwencji genu SSU rDNA również wykazała, że bioróżnorodność AMF była znacznie wyższa w glebie niż w korzeniach. Fakt, że tylko pewna frakcja AMF obecna w glebie aktywnie kolonizuje korzenie, potwierdzają wyniki badań przeprowadzonych przez Balestrini i wsp. (2010). Obserwowanej różnicy w bioróżnorodności AMF w glebie i korzeniach nie wykazano jednak za pomocą NGS, w którym sekwencjonowano fragmenty genu LSU rDNA. Różnica ta mogła wynikać z niskiej specyficzności starterów użytych w metodzie DGGE, które przyczyniły się do obecności w żelu licznych produktów PCR nie należących do *Glomeromycotina*. W porównaniu do endosfery korzeni, gleba okołokorzeniowa charakteryzuje się zazwyczaj wyższą bioróżnorodnością mikroorganizmów, co może tłumaczyć większą liczbę prążków

w profilu DGGE otrzymanym dla prób glebowych, w porównaniu do prób z korzeni (Fitzpatrick i wsp., 2018). Zastosowanie starterów dla genu SSU rDNA w technice DGGE, mogło prowadzić również do nadreprezentacji w glebie AMF z rodziny *Glomeraceae*, które charakteryzują się produkcją ogromnej ilości spor zawierających dużo DNA (Cornejo i wsp., 2004; Kohout i wsp., 2014). Zatem, DGGE jest szybką i taną metodą, odpowiednią do wstępnego porównania bioróżnorodności społeczności AMF; jednakże, do szczegółowej charakterystyki ich struktury wymagane jest przeprowadzenie wysokoprzepustowego sekwencjonowania bibliotek metagenomowych.

Analiza β -bioróżnorodności oparta zarówno na profilach DGGE, MOTUs, jak i dystansie filogenetycznym wykazała, iż sześć badanych społeczności AMF związanych z różnymi terenami, gatunkami roślin i glebą lub korzeniami, grupuje się w trzy różniące się od siebie istotnie metaspołeczności charakterystyczne dla: terenu zanieczyszczonego (bez różnic pomiędzy gatunkami roślin), *P. trivialis* z terenu niezanieczyszczonego oraz *Ph. australis* z terenu niezanieczyszczonego. Gatunek gospodarza roślinnego miał znaczenie w kształtowaniu bioróżnorodności społeczności AMF w terenie niezanieczyszczonej, ale nie wywierał istotnego wpływu na różnorodność społeczności AMF związanych z zanieczyszczonej terenem wokół stawu Kalina. Zastosowane metody statystyczne wykazały niską istotność różnic w β -bioróżnorodności pomiędzy społecznościami glebowymi i korzeniowymi na badanych terenach. Metody ilościowe (indeks Yue i Claytona, metoda UniFrac ważona), biorące pod uwagę wagę każdego z MOTUs lub gałęzi drzewa filogenetycznego, dały podobne wyniki z bardzo wyraźną separacją prób względem badanych terenów, a w przypadku terenu kontrolnego również roślin, wykazując niską istotność różnic pomiędzy glebą i korzeniami. Istotność różnic w wartościach wskaźników β -bioróżnorodności społeczności AMF pomiędzy glebą i korzeniami na terenie niezanieczyszczonej wykazała metoda UniFrac nieważona, uwzględniająca tylko obecność lub brak danego taksonu w społeczności. Zatem, gatunek gospodarza roślinnego miał istotny wpływ na bioróżnorodność społeczności AMF jedynie w warunkach braku narażenia na działanie czynnika stresowego. Brak istotnego wpływu gospodarza roślinnego na β -bioróżnorodność społeczności AMF w glebie zanieczyszczonej węglowodorami stwierdzono również w badaniach Hassana i wsp. (2014) oraz Iffisa i wsp. (2016). Podobnie, la Providencia i wsp. (2015) wykazali brak znaczenia gospodarza roślinnego na terenie zanieczyszczonej węglowodorami, jednakże przy istotnych różnicach w wartościach wskaźników β -bioróżnorodności społeczności AMF związanych z glebą i korzeniami,

których, wbrew hipotetycznym założeniom, nie obserwowano w niniejszych badaniach. Z drugiej strony, Garcez-Ruiz i wsp. (2017) wykazali istotny wpływ poziomu zanieczyszczenia i gatunku gospodarza roślinnego na kształtowanie β -bioróżnorodności AMF. Zatem, wpływ gatunku rośliny na bioróżnorodność AMF w glebach zanieczyszczonych fenolem i/lub węglowodorami, może być uwarunkowany specyfiką środowiska oraz gatunku gospodarza roślinnego.

Zanieczyszczenie gleby miało ogromny wpływ na strukturę gatunkową społeczności AMF. Analiza wyników NGS wykazała dominację *P. laccatum*, *Rhizophagus* sp., *Funneliformis* sp. i *C. luteum* w metaspołeczności AMF związanej z terenem zanieczyszczonym. Poza *P. laccatum*, powyższe gatunki zostały również zidentyfikowane jako gatunki dominujące metodą DGGE. Jedyną różnicą pomiędzy strukturą społeczności AMF w glebie i w korzeniach, był większy udział grzybów z rodzaju *Rhizophagus* sp. w społecznościach AMF w korzeniach. Wynik ten mógł być związany z intensywnym wytwarzaniem przez AMF z tego rodzaju spor wewnątrzkorzeniowych, które zawierają dużo materiału genetycznego, co przełożyło się na relatywnie większą liczbę odczytów w NGS. Wymienione rodzaje były już wcześniej identyfikowane jako najczęściej dominujące w środowiskach zanieczyszczonych węglowodorami. AMF z rodzaju *Funneliformis*, który był ściśle związany tylko z badanym środowiskiem skażonym, został wcześniej opisany jako ekstremalny, spontaniczny dominant w mokradle sztucznie skonstruowanym na potrzeby fitoremediacji wód gruntowych (Fester, 2013) oraz w silnie zanieczyszczonych glebach na terenie Niemiec i Argentyny (Cabello, 1997). Hassan i wsp. (2014) oraz Iffis i wsp. (2016) odnotowali odpowiednio, 90% i 65% udział rodzaju *Rhizophagus* w społecznościach AMF zasiedlających gleby zanieczyszczone węglowodorami, który obniżał się wraz ze spadkiem stężenia zanieczyszczeń. Niektóre badania wykazały wysoki potencjał AMF z rodzaju *Claroideoglomus* do szybkiej kolonizacji korzeni roślin w zanieczyszczonych środowiskach, pod warunkiem, że nie były one silnie zdominowane przez rodzinę *Glomeraceae* (Hassan i wsp., 2014; la Providencia i wsp., 2015; Iffis i wsp., 2016).

W przypadku AMF, ważniejsza od bioróżnorodności gatunkowej jest ich różnorodność funkcjonalna, którą można opisać przytaczając koncepcję trzech głównych typów strategii życiowych: konkurencyjnej, ruderalnej i tolerowania stresu (C-S-R) (Grime i Pierce, 2012). Według tej koncepcji, AMF tolerujące stres, których można by się spodziewać w środowiskach zanieczyszczonych węglowodorami, charakteryzuje wolne tempo wzrostu przy wytwarzaniu niskiej, lecz długo żyjącej biomasy. Grzyby te inwestują

dużą część zasobów w obronę konstytutywną. Jednakże, strategia życiowa rodziny *Glomeraceae*, których dominację w środowiskach zanieczyszczonych węglowodorami wykazano zarówno w niniejszej pracy, jak i w innych doniesieniach, jest bliższa charakterystyce organizmów ruderalnych (Chagnon i wsp., 2013; Hassan i wsp., 2014; la Providencia i wsp., 2015; Iffis i wsp., 2016). W przeciwieństwie do AMF tolerujących stres, AMF ruderalne charakteryzuje szybkie tempo wzrostu i krótki cykl życiowy. Jednakże, w związku z niewielkim zapotrzebowaniem *Glomeraceae* na węgiel, klasyfikuje się je również jako AMF tolerujące stres (Lerat i wsp., 2003; Chagnon i wsp., 2013). W koncepcji C-S-R podkreśla się tendencję ruderalnych AMF do formowania symbiozy z ruderalnymi roślinami. Wykorzystywane w tych badaniach *P. trivialis* i *Ph. australis* są gatunkami ruderalnymi, co również wyjaśnia występowanie grzybów z rodziny *Glomeraceae* jako ich dominujących partnerów symbiotycznych (Chagnon i wsp., 2013).

Wielu autorów kieruje się bardziej ogólnym podziałem *Glomeromycotina* na „generalistów” i „specjalistów”. *Glomeraceae* jako najbardziej pospolita rodzina AMF, należy do „generalistów”. Przedstawiciele tej rodziny cechują się niskimi wymaganiami środowiskowymi, zdolnością do szybkiej kolonizacji różnorodnych systemów korzeniowych i wytwarzaniem dużej ilości spor, również wewnątrz korzeni roślin, co zapewnia im ochronę przed bezpośrednim wpływem zanieczyszczeń obecnych w glebie. Te właściwości w prosty sposób tłumaczą ich umiejętność przetrwania w warunkach narażenia na zanieczyszczenia i inne stresy abiotyczne, także w środowiskach porośniętych przez ruderalne i inwazyjne gatunki roślin (Davison i wsp., 2011; Moora i wsp., 2011; Wang i wsp., 2015; Lenoir i wsp., 2016; Aguilar-Trigueros i wsp., 2019).

Skład gatunkowy społeczności AMF na terenie niezanieczyszczonym zależał od gatunku gospodarza roślinnego. Analiza wyników NGS wykazała, że dominującymi gatunkami AMF w glebie okołokorzeniowej *P. trivialis* były: *P. brasilianum*, *Archaeospora* sp., *Dominikia* sp., *D. emiratia* i *Rhizophagus* sp. Analiza sekwencji z profili DGGE sugerowała znaczny udział *Dominikia* sp., *Claroideoglossus* sp., *Glomus* sp. i *Diversispora-Otospora* sp. NGS potwierdziło występowanie trzech ostatnich rodzajów w niezanieczyszczonej glebie okołokorzeniowej *P. trivialis*, natomiast ich udział w społeczności AMF był mało znaczący. Społeczność AMF charakterystyczna dla *Ph. australis* na terenie niezanieczyszczonym była silnie zdominowana przez *Archaeospora* sp., ze znaczącym udziałem *Paraglossus* sp. i *Rhizophagus cerebriforme*. Dominację *Archaeospora* sp. i *Rhizophagus* sp. obserwowano również w analizie DGGE. Podobnie jak

w terenie zanieczyszczonym, obserwowano większy udział *Rhizophagus* sp. w społecznościach AMF występujących w korzeniach, w porównaniu do gleby. Obecność tak zróżnicowanych rodzajów świadczy o występowaniu różnorodnej, zarówno gatunkowo, jak i funkcjonalnie, zbilansowanej ekologicznie społeczności AMF. Wymienione rodzaje były wcześniej notowane zarówno w społecznościach AMF terenów zanieczyszczonych węglowodorami, jak i niezanieczyszczonych (Hassan i wsp., 2014; Garcés-Ruiz i wsp., 2017; Krüger i wsp., 2017).

W naszych badaniach, rodzaj *Dominikia* stanowił znaczącą część społeczności AMF na terenie niezanieczyszczonym. Rodzaj ten został opisany po raz pierwszy w roku 2015 (Błaszowski i wsp., 2015) i dlatego niewiele jest danych literaturowych, które opisują jego występowanie i udział w społecznościach AMF. Wcześniej, sekwencje identyfikujące *Dominikia* sp. klasyfikowano jako *Glomus* sp. (Oehl i wsp., 2015). Dominację *Dominikia* sp. w społecznościach AMF obserwowano w pierwszych stadiach sukcesji roślinności w środowiskach antropogenicznych, takich jak hałdy węgla brunatnego porośnięte roślinami z rodziny *Poaceae* (Krüger i wsp., 2017). Przedstawiciele tej samej rodziny roślin dominowały również w badanym środowisku nadbrzeża jeziora Kokotek, co może tłumaczyć obecność AMF z tego rodzaju na terenie kontrolnym. Inne badania wskazują na występowanie AMF z rodzaju *Dominikia* w wykorzystywanych rolniczo czarnoziemach. Opisano go jako indykatora gleby żyznej, nieprzenawożonej i uprawianej w sposób zrównoważony (Baltruschat i wsp., 2019). Rodzaj ten wydaje się więc być związany, nie tyle z określonymi środowiskami, co ze środowiskami niezdominowanymi przez szybko rosnące, ruderalne rodzaje AMF, jak np. *Rhizophagus* czy *Funneliformis*, które szybko zajmują dostępną niszę ekologiczną (Chagnon i wsp., 2013).

Charakterystyczną cechą wszystkich opisanych społeczności AMF był zaskakująco wysoki udział rodzaju *Paraglomus*, reprezentujący najbardziej pierwotne AMF (Smith i Read 2008). Rodzaj ten nie był wcześniej rozpoznany jako znacząca składowa społeczności AMF, w badaniach zarówno terenów niezanieczyszczonych, jak i zanieczyszczonych węglowodorami. Jedynie Hassan i wsp. (2014) odnotowali istotny udział *Paraglomeraceae* w glebie o niskim poziomie zanieczyszczenia, otaczającej teren silnie skażony węglowodorami. Sporadyczna rozpoznawalność rodziny *Paraglomeraceae* w społecznościach AMF, może nie być związana z ich rzadkim występowaniem w środowisku, ale leżeć w przyczynach metodycznych. W większości badań opartych na sekwencjonowaniu wysokoprzepustowym wykorzystywano startery oparte na sekwencji

genu SSU rDNA, które zaniżają reprezentatywność rodziny *Paraglomeraceae* w społecznościach AMF (Van Geel i wsp., 2014). Ponadto, większość biomasy *Paraglomeraceae* zawiera się w ERM, przy jednoczesnym wytwarzaniu licznych, ale bardzo małych spor i niewielkiej biomasy IRM. Może to powodować trudności w uzyskaniu odpowiedniej ilości materiału genetycznego podczas izolacji, szczególnie z korzeni, a zatem obniżać reprezentatywność sekwencji przynależnych do *Paraglomeraceae* w puli DNA środowiskowego (Hempel i wsp., 2007; Aguilar-Trigueros i wsp., 2019). Technika zagnieżdżonej reakcji PCR, zastosowana w niniejszych badaniach w celu wzbogacenia AMF-specyficznej puli DNA, mogła przyczynić się do zwiększenia reprezentatywności sekwencji genu LSU rDNA charakterystycznych dla *Paraglomeraceae*. W podobny sposób można uzasadnić dominację rodzaju *Archaeospora* w społecznościach AMF reprezentujących teren kontrolny. Obok *Paraglomeraceae*, *Archaeosporaceae* reprezentują drugą najbardziej pierwotną rodzinę AMF, o zbliżonej morfologii i bliskim pokrewieństwie filogenetycznym. Sekwencje rybosomalne AMF z rodziny *Archaeosporaceae* są wysoce zróżnicowane, a przez to dyskryminowane przez najczęściej stosowane markery molekularne, które nie wykazują odpowiedniej rozdzielczości (Morton i Redecker 2001). Zatem, nie można wykluczyć, że pierwotne i mało wyspecjalizowane *Paraglomeraceae* i *Archaeosporaceae* mogą występować pospolicie w wielu społecznościach AMF. Niski poziom ich detekcji metodami molekularnymi może wynikać z dwóch przyczyn: stosunkowo niskiej biomasy, w porównaniu do innych, młodszych ewolucyjnie linii *Glomeromycotina* oraz niskiej specyficzności stosowanych zazwyczaj markerów molekularnych. Co więcej, delikatne IRM AMF z rodzin *Paraglomeraceae* i *Archaeosporaceae* trudno się wybarwia, a produkowane przez nie spory są małe i transparentne, zatem struktury te można łatwo przeoczyć pod mikroskopem (Oehl i wsp., 2011; Souza, 2015). Problemy z detekcją obu rodzin w środowisku napotykamy więc stosując zarówno metody molekularne, jak i klasyczne.

W środowisku niezanieczyszczonym, istotny wpływ na skład społeczności AMF miał gatunek gospodarza roślinnego. *Ph. australis* i *P. trivialis* reprezentują wieloletnie trawy ruderalne, jednak różniące się pokrojem morfologicznym i formami życiowymi. *P. trivialis* jest pospolitym hemikryptofitem wilgotnych łąk i pastwisk. W związku z dużą odpornością mechaniczną, jest trawą często wysiewaną na glebach niskiej jakości i glebach zanieczyszczonych (Liu i wsp., 2017). *Ph. australis* jest inwazyjnym halofitem. W województwie śląskim, występuje w bardzo skrajnych środowiskach, porastając zarówno

typowe dla tego gatunku tereny podmokłe i nadbrzeżne, jak i skrajnie suche hałdy węgla kamiennego, czy hałdy cynkowo-ołowiowe (Talik i wsp., 2018). Jest to roślina znana z wysokiego potencjału fitoremediacyjnego, również we współpracy z AMF (Fester, 2013; Huang i wsp., 2017). Fester i wsp. (2013) obserwowali intensywną kolonizację korzeni *Ph. australis* przez AMF z grupy „generalistów” w mokradle skonstruowanym na potrzeby oczyszczenia wód gruntowych z benzenu, eteru metylowo-tetr-butylowego i amoniaku. Huang i wsp. (2017), obserwowali zwiększoną akumulację kadmu w korzeniach *Ph. australis* skolonizowanych przez *R. irregularis*, w porównaniu do roślin niemikoryzowych. Wiadomo, że AMF nie tworzą z roślinami symbiozy specyficznej gatunkowo, lecz dobór symbiontów opiera się na różnorodności funkcjonalnej i uzależniony jest od oddziaływania czynników środowiskowych. Określone AMF mogą zatem preferencyjnie kolonizować pewne gatunki w danym środowisku (Magurno i wsp., 2015). W zanieczyszczonym środowisku stawu Kalina, gatunek gospodarza roślinnego miał marginalny wpływ na skład społeczności AMF. Natomiast, w bardziej zrównoważonym środowisku niezanieczyszczonym, bioróżnorodność społeczności AMF była uwarunkowana takimi czynnikami jak: zapotrzebowanie roślin na azot i fosfor, szybkość przyrostu biomasy, architektura systemu korzeniowego oraz skład wydzielin korzeniowych (Nagahashi i wsp., 2010; Marquez-Garcia i wsp., 2014; De Smet i wsp., 2015; Rohrbacher i St-Arnaud, 2016).

5.1.4. Biomasa mikroorganizmów w glebie okołokorzeniowej

Obecność fenolu i PAH miała istotny wpływ na biomasę grzybów saprofitycznych i badanych grup bakterii jedynie w glebie okołokorzeniowej *Ph. australis*. Stwierdzono w niej większą biomasę bakterii Gram-dodatnich, promieniowców i grzybów saprofitycznych, w porównaniu do ich biomasy w glebie niezanieczyszczonej. Wyniki te nie potwierdzają hipotezy, że zanieczyszczenia negatywnie wpływają na biomasę mikroorganizmów glebowych. Nie obserwowano natomiast, istotnego wpływu fenolu i PAH na biomasę bakterii oraz grzybów w glebie wokół korzeni *P. trivialis*.

Ponadto, analiza CCA profili PLFA wykazała, że zanieczyszczenie gleby miało silniejszy wpływ na różnorodność społeczności mikroorganizmów związanych z *Ph. australis*, w porównaniu do *P. trivialis*. Głębokie i rozległe korzenie oraz kłącza *Ph. australis* mogą stymulować aktywność mikroorganizmów glebowych, również tych degradujących węglowodory, gdyż architektura systemu korzeniowego *Ph. australis*,

tworzącego liczne pory, sprzyja lepszemu natlenieniu gleby i osadów, zwiększając ich potencjał redoks (Gregorio i wsp., 2014). *Ph. australis* może również pośredniczyć w mikrobiologicznej degradacji węglowodorów poprzez produkcję wydzielin korzeniowych bogatych w związki fenolowe (Toyama i wsp., 2011). Natomiast, nie wykazano stymulacji aktywności mikrobiologicznej w glebie przez *P. trivialis*. Nawet w przypadku intensywnej kolonizacji korzeni tego gatunku przez AMF (Shahzad i wsp., 2015). Niniejsze badania również wykazały nieznaczny wpływ *P. trivialis* na zespoły mikroorganizmów glebowych. Niższy potencjał *P. trivialis* do stymulacji aktywności mikroorganizmów glebowych może wynikać z jej płytkiego systemu korzeniowego (Shahzad i wsp., 2015; Zwicke i wsp., 2015). Ponadto, wbrew założonej hipotezie, w glebie okołokorzeniowej *P. trivialis* nie wykazano żadnego związku pomiędzy biomasą różnych grup mikroorganizmów a biomasą AMF.

Na szczególną uwagę zasługują promieniowce, gdyż odgrywają one istotną rolę w degradacji aromatycznych zanieczyszczeń organicznych (Reh fuss i Urban 2005; Pizzul i wsp., 2006; Płociniczak i wsp., 2017). Zauważono, iż w glebie okołokorzeniowej *Ph. australis*, biomasa promieniowców i bakterii Gram-dodatnich była negatywnie skorelowana z biomasą i wskaźnikami bioróżnorodności AMF. Zazwyczaj obserwuje się synergistyczne działanie AMF i bakterii, co założono w postawionej hipotezie badawczej. Mutualizm pomiędzy AMF i bakteriami skutkuje lepszym wzrostem i ochroną roślin oraz większą efektywnością ryzodegradacji związków organicznych (Rajtor i Piotrowska-Seget 2016). Z drugiej strony, obserwowano również supresyjny wpływ społeczności mikroorganizmów na rozwój AMF. Znaczącą część tych społeczności stanowiły promieniowce, produkujące szerokie spektrum naturalnych fungicydów (Svenningsen i wsp., 2018; Wang i wsp., 2018). Właściwości supresyjne mikroorganizmów glebowych wykazano wobec *R. irregularis* i *F. mosseae* (Svenningsen i wsp., 2018), które w przypadku niniejszych badań były gatunkami AMF dominującymi w zanieczyszczonym środowisku stawu Kalina.

5.2. Kolekcja kultur AMF wyizolowanych z badanych środowisk

Jednym z celów niniejszej pracy była izolacja gatunków AMF dominujących w badanych środowiskach, szczególnie w środowisku zanieczyszczonym oraz sprawdzenie ich potencjału we wspomaganiu wzrostu roślin w warunkach skażenia. Jednakże, izolacja spor gatunków AMF dominujących w próbach środowiskowych okazała się niemożliwa, ponieważ gatunki te nie wytwarzały spor w warunkach laboratoryjnych. W kulturach

pułapkowych AMF wytwarzają więcej spor niż w środowisku naturalnym; jednakże, produkowane są one tylko przez niektóre gatunki AMF (Trejo-Aguilar i wsp., 2013). W przypadku niniejszych badań, najwięcej spor wytworzyły AMF, które nie były gatunkami dominującymi w środowisku. Z wyjątkiem *Dominikia* sp., ich udział w społecznościach AMF wynosił kilka procent.

Wpływ na rozwój AMF w kulturach pułapkowych może mieć wiele czynników, takich jak: gatunek gospodarza roślinnego, skład granulometryczny podłoża hodowlanego, temperatura i oświetlenie, a także ilość składników odżywczych i nawodnienie (Yao i wsp., 2010; Trejo-Aguilar i wsp., 2013; López-García i wsp., 2014). W celu zapewnienia wysokiej różnorodności gatunkowej i funkcjonalnej, doniczki obsadzono kilkoma gatunkami roślin mikoryzowych rutynowo stosowanych w kulturach pułapkowych (*P. lanceolata*, *T. pratense*, *M. sativa*, *H. vulgare*). Jednakże, nie występowały one w naturalnych społecznościach roślinnych badanych nadbrzeży. Przeprowadzona analiza granulometryczna wykazała, że badane próbki gleby to piasek gliniasty, podczas gdy do kultur laboratoryjnych zastosowano podłoże piaszczyste, ograniczając do minimum frakcję organiczną i pylistą gleby. Standardowo, frakcje te eliminuje się w celu łatwiejszego sprawdzenia rozwoju mikoryzy i standaryzacji stężenia składników odżywczych, które dodawano do podłoża w formie roztworu. Kontrolowanie nawożenia ma szczególne znaczenie w przypadku fosforu, którego zbyt duże stężenie w podłożu nie sprzyja rozwojowi mikoryzy (Johnson i wsp., 2015). Ponadto, AMF wykazują rozwój sezonowy, a biorąc pod uwagę, że próby środowiskowe były pobierane latem, laboratoryjne warunki hodowli, dalece odmienne od tych środowiskowych, mogły mieć znaczny wpływ na produkcję spor przez AMF (López-García i wsp., 2014).

Problemem jest nie tylko izolacja AMF, ale również hodowla bakterii i grzybów saprofitycznych na sztucznych podłożach w standardowych warunkach laboratoryjnych. Możliwa jest hodowla tylko niewielkiej frakcji mikroorganizmów glebowych, które są zdolne do wzrostu na podłożach o określonym składzie, przy określonych warunkach inkubacji. Często okazuje się, że gatunki mikroorganizmów dominujących w natywnej społeczności mikroorganizmów są mikroorganizmami niehodowlanymi (Boughner i Singh, 2016). Rozwiązaniem, które umożliwia izolację większej ilości gatunków mikroorganizmów jest hodowla *in situ* z wykorzystaniem iChipa. Jest to urządzenie, którego mikrokanaliki wypełnia się pożywką wymieszaną z roztworem glebowym, a następnie zabezpiecza półprzepuszczalną membraną i umieszcza w glebie. Zapewnia to

mikroorganizmom bezpośredni dostęp do składników odżywczych zawartych w roztworze glebowym (Nichols i wsp., 2010). Podobny system warto byłoby opracować do izolacji AMF, np. umieszczając w glebie cylindry z membrany o średnicy porów na tyle małej, aby były przepuszczalne dla strzępki AMF, ale nie dla korzeni roślin. Wewnątrz cylindrów znajdowałyby się podłoże obsadzone roślinami mikoryzowymi odpowiednimi dla badanego środowiska. Podobne systemy od lat stosuje się w dwukompartymentowych układach badawczych, w których membraną oddziela się ryzosferę (gleba + korzenie + strzępka AMF) od mykosfery (gleba + strzępka AMF) (Frey i Schüepp, 1993; Qin i wsp., 2016).

5.3. Wpływ zanieczyszczenia fenolem i PAH na rozwój wyizolowanych szczepów AMF i ich potencjał we wspomaganiu wzrostu roślin

Zgodnie z założoną hipotezą badawczą, AMF pozyskane z zanieczyszczonego środowiska wykazały wysoki potencjał we wspomaganiu wzrostu roślin w warunkach skażenia fenolem i PAH. Jednakże, wpływ AMF na poziom stresu oksydacyjnego i aktywność enzymów antyoksydacyjnych w tkankach roślinnych był niejednoznaczny i różnił się, w zależności od zastosowanego układu doświadczalnego. Do badań wybrano izolaty AMF różnorodne gatunkowo i funkcjonalnie, co skutkowało wysoką zmiennością interakcji zarówno pomiędzy gatunkami AMF, jak i pomiędzy AMF i gospodarzem roślinnym. *C. walkeri* i *F. caledonium* należą do tego samego rzędu, *Glomerales*, lecz reprezentują różne rodziny, *Claroideoglomeraceae* i *Glomeraceae*. *C. walkeri* jest gatunkiem rzadkim, natomiast *Glomeraceae* należą do AMF o niskich wymaganiach ekologicznych, które występują pospolicie w różnych środowiskach, wytwarzają dużo biomasy i szybko kolonizują korzenie roślin. Tworzona przez nie mikoryza rozwija się dynamicznie nie tylko ze spor, ale również z fragmentów korzeni zawierających strzępkę. *D. varaderana* reprezentuje rząd *Diversisporales*, identyfikowany w społecznościach AMF wielu środowisk, natomiast bez tendencji do dominacji. *Diversisporaceae*, w porównaniu do *Glomeraceae* i *Claroideoglomeraceae*, wytwarzają mniejszą biomasę, zarówno wewnątrz, jak i zewnątrzkorzeniową, charakteryzują się wolniejszym wzrostem, a jako propagule służą u nich głównie spory i ERM. Pomimo zróżnicowanych strategii życiowych, zarówno *Glomerales* jak i *Diversisporales* posiadają mechanizmy obrony przed bezpośrednim oddziaływaniem czynników stresowych. *Glomerales*, poprzez alokację biomasy do IRM, natomiast *Diversisporales*, poprzez wytwarzanie mycelium o silnych

właściwościach regeneracyjnych i wysokiej żywotności (Chagnon i wsp., 2013; Varela-Cervero i wsp., 2016; Aguilar-Trigueros i wsp. 2019).

Powyższe gatunki wprowadzono jako szczepionki jednogatunkowe, bądź inokulum trójgatunkowe do doniczek z wysianą życicą trwałą. Wprowadzenie inokulum trójgatunkowego wpłynęło na wzrost i biomasę roślin w odmienny sposób, w porównaniu do inokulacji pojedynczymi gatunkami AMF. Inokulacja pojedynczym gatunkiem AMF wspomagała wzrost roślin bez względu na to, czy rosły one w podłożu nieskażonym, czy skażonym fenolem i PAH. Wbrew założonej hipotezie, trójgatunkowe inokulum mikoryzowe nie promowało, a nawet osłabiło wzrost sadzonek *L. perenne* w podłożu nieskażonym oraz skażonym niską dawką fenolu i PAH (5/20 mg fenolu/PAH kg⁻¹). Osłabienie wzrostu roślin mogło wynikać z nadmiernego rozwoju *C. walkeri*, który obserwowano tylko przy jednoczesnej inokulacji *F. caledonium* i *D. varaderana* w warunkach niskiego poziomu skażenia lub braku skażenia. Intensywna sporulacja *C. walkeri* mogła zaburzyć równowagę symbiotyczną mikoryzy powodując zbyt dużą podaż węgla przez roślinę do grzybów, co skutkowało osłabieniem wzrostu gospodarza roślinnego (Smith i Smith, 2013; Friede i wsp., 2016). Dominacja *C. walkeri* mogła wynikać z konkurencyjnych zależności pomiędzy gatunkami AMF (Jansa i wsp., 2008; Janoušková i wsp., 2009; Thonar i wsp., 2014). Przy trzykrotnie większej produkcji spor przez *C. walkeri*, *F. caledonium* wytworzył dwa razy więcej spor, w porównaniu do kultur jednogatunkowych, natomiast rozwój *D. varaderana* został całkowicie zahamowany. Przy średnim (15/60 mg fenolu/PAH kg⁻¹) i wysokim (30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹) poziomie skażenia, rozwój mikoryzy w kulturach inokulowanych trzema gatunkami AMF był bardziej zbilansowany, wpływając pozytywnie na wzrost *L. perenne*. Badania nad interakcjami pomiędzy różnymi gatunkami AMF wykazały, że mogą one zarówno zasiedlać ten sam system korzeniowy przy zachowaniu wysokiego stopnia kolonizacji, jak i wzajemnie się wykluczać. Janoušková i wsp. (2009) nie wykazali wzajemnego wykluczenia przestrzennego pomiędzy *C. claroideum* i *R. irregularis* kolonizujących systemy korzeniowe *Calamagrostis epigejos* i *Tripleurospermum inodorum*. Natomiast, Jansa i wsp. (2008) wykazali, że w kulturach *A. porrum* i *M. truncatula* inokulowanych trzema gatunkami AMF jednocześnie: *F. mosseae*, *R. intraradices* i *C. claroideum*, *F. mosseae* dominował w społeczności AMF, podczas gdy *C. claroideum* rozwinął się najslabiej. Przeciwnie, porównując równoczesny rozwój *F. mosseae* i *R. intraradices* w systemach korzeniowych innych gospodarzy roślinnych, Alkan i wsp. (2006) wykazali dominację

R. intraradices. Thonar i wsp. (2014), inokulując *M. truncatula* wykazali, że *R. intraradices* i *C. claroideum* konkurowały ze sobą, podczas gdy *R. intraradices* i *G. margarita* stymulowały wzajemnie swój rozwój. Co ciekawe, w kulturach, w których obserwowano zależności konkurencyjne pomiędzy *R. intraradices* i *C. claroideum*, wykazano, że jednoczesna inokulacja tymi gatunkami AMF miała lepszy na wzrost roślin, w porównaniu do inokulacji pojedynczymi gatunkami. Natomiast, potencjał do stymulacji wzrostu roślin wprowadzonych jednocześnie *R. intraradices* i *G. margarita* był niższy niż w monokulturach (Thonar i wsp., 2014). Z powyższych przykładów wynika, że charakter interakcji pomiędzy AMF, a także ich wpływ na gospodarza roślinnego, zależą od kombinacji gatunków AMF, ich następstwa, gęstości inokulum mikoryzowego, gatunku gospodarza roślinnego i specyficznych dla danego eksperymentu warunków środowiskowych (Janoušková i wsp., 2009; Thonar i wsp., 2014). Inne badania nad ekologią AMF sugerują, że im większy dystans filogenetyczny pomiędzy gatunkami AMF, tym wyższa różnorodność funkcjonalna i mniejsza konkurencyjność pomiędzy nimi, co ma przełożenie na bardziej zbilansowany rozwój zarówno AMF, jak i gospodarza roślinnego (Maherali i Klironomos, 2007). Pomimo tego, że AMF w zaprojektowanym układzie reprezentowały różne rodziny *Glomeromycotina*, doszło do silnej konkurencji pomiędzy nimi. W przypadku badanej społeczności, konkurencja pomiędzy gatunkami wynikała najprawdopodobniej z „efektu pierwszeństwa”. Najszybciej rozwijający się *C. walkeri* zajął całą niszę środowiskową ograniczoną niewielką doniczką, pobierając większość zasobów węgla od gospodarza roślinnego, a przy tym utrudniając wzrost innym gatunkom AMF (Werner i Kiers, 2015). Konkurencyjność *C. walkeri* wobec pozostałych gatunków AMF w zastosowanym układzie doświadczalnym spadła pod wpływem wyższych stężeń fenolu i PAH, które działając toksycznie zahamowały jego intensywny rozwój.

Znaczne różnice we wzroście i biomasie roślin, a także pokroju morfologicznym ich pędów, zaobserwowano pomiędzy roślinami zaszczepionymi pojedynczymi gatunkami AMF. Spośród wykorzystanych gatunków, *F. caledonium* najefektywniej wspomagał wzrost pędów oraz zwiększył biomasę pędów i korzeni *L. perenne*, bez względu na poziom skażenia podłoża. Sadzonki inokulowane *F. caledonium* wytwarzały szersze, dłuższe i bardziej zielone blaszki liściowe, w porównaniu do roślin nieinokulowanych. Dotychczasowe badania dowodzą bardzo wysokiej efektywności pokrewnego gatunku, *F. mosseae* w promowaniu wzrostu roślin narażonych na działanie PAH. Przykładowo, Cheung i wsp. (2008), w wyniku inokulacji *F. mosseae*, uzyskali kilkukrotnie wyższą

biomasę *Corchotus capsulari* w glebie skażonej antracenenem (do 150 mg/kg). Rabie (2005) obserwował wzrost biomasy *T. aestivum*, *V. radiata* i *S. melongea* o odpowiednio, 93%, 52% i 21% w glebie skażonej mieszką PAH (500 mg/kg). Układy z *F. mosseae* i *L. perenne* zostały również z sukcesem zastosowane we wspomaganiu fitoremediacji podłoży skażonych mieszką PAH, wykazując pozytywny wpływ *F. mosseae* na kondycję roślin i degradacyjną aktywność mikroorganizmów glebowych (Binet i wsp., 2000; Joner i wsp., 2001; Joner i Leyval, 2001, 2003).

Wzrost i biomasa pędów *L. perenne*, zarówno w kulturach skażonych fenolem i PAH, jak i kontrolnych, były również stymulowane wprowadzonym do podłoża *D. varaderana*. Pomimo, iż *Diversisporaceae* występowały w społecznościach AMF na terenach zanieczyszczonych węglowodorami (la Providencia i wsp., 2015), potencjał izolatów AMF z tej rodziny we wspomaganiu wzrostu roślin pod wpływem zanieczyszczenia nie był dotychczas badany.

Rośliny inokulowane *C. walkeri* wytwarzały więcej blaszek liściowych, jednakże były one cieńsze, krótsze i szybciej usychały, w porównaniu do roślin kontrolnych. Istotną stymulację wzrostu pędów *L. perenne* przez *C. walkeri* zaobserwowano jedynie przy braku skażenia. Ponadto, *C. walkeri* istotnie obniżył biomasę korzeni, co obserwowano również w kulturach inokulowanych konsorcjum AMF, w których doszło do agresywnego rozwoju tego gatunku. Jak wskazują dane literaturowe, AM sprzyja alokacji biomasy do pędów rośliny, obniżając stosunek biomasy korzeni do pędów. Efekt ten wynika z faktu, że roślina nie musi inwestować zbyt dużych nakładów na wytwarzanie biomasy korzeniowej, ponieważ AM umożliwia bardziej efektywny pobór składników odżywczych. Wpływ AM na rozkład biomasy u gospodarza roślinnego może być uwarunkowany jego indywidualną odpowiedzią na dany gatunek AMF, oddziaływaniem czynników stresowych, stężeniem składników odżywczych w podłożu i objętością podłoża wzrostowego. Metaanaliza wykazała, że obecność czynnika stresowego może niwelować wpływ AM na alokację biomasy do części nadziemnych rośliny (Veresoglou i wsp., 2011; Dreyer i wsp., 2014); jednakże, nie obserwowano tego w niniejszych badaniach. W przypadku ekstensywnego wzrostu *C. walkeri* w mieszanych kulturach AMF, doszło do obniżenia biomasy zarówno korzeni, jak i pędów, co mogło być związane z zaburzonym bilansem węgla w roślinie. *C. walkeri* jako pojedynczy inokulant obniżył biomasę korzeni; jednakże, wspierając jej alokację do pędów. W przypadku inokulacji *F. caledonium*, a także, choć w mniejszym

stopniu, *D. varaderana*, obserwowano wzrost biomasy całej rośliny, jednak wciąż z alokacją biomasy do pędów.

Badane parametry wzrostu *L. perenne* nie były w żaden sposób skorelowane z intensywnością kolonizacji mikoryzowej korzeni. Pomimo zróżnicowanego wpływu *F. caledonium* i *C. walkeri* na biomasę roślin, gatunki te kolonizowały korzenie z podobną intensywnością. Zatem, podobnie jak w przypadku doniesień literaturowych, intensywność kolonizacji mikoryzowej jest często, ale nie zawsze pozytywnie skorelowana z lepszym wzrostem gospodarza roślinnego (Treseder, 2013). Większy wpływ na intensywność kolonizacji mogą mieć właściwości AMF. *Glomeraceae* kolonizują systemy korzeniowe z wysoką intensywnością, w przeciwieństwie do *Diversisporaceae* (Chagnon i wsp., 2013; López-García i wsp., 2014), co potwierdzono w niniejszych badaniach. Zarówno *F. caledonium*, jak i *C. walkeri* lepiej kolonizowały korzenie roślin i wytwarzały więcej arbuskul przy niskim i średnim poziomie skażenia, w porównaniu do nieskażonych układów kontrolnych. Mimo słabszej kolonizacji korzeni w kulturach nieskażonych lub skażonych wysoką, toksyczną dawką fenolu i PAH, AMF, a w szczególności *F. caledonium*, skutecznie wspomagały rozwój roślin. W przypadku *D. varaderana*, a także inokulacji trzema gatunkami AMF, nawet najmniejsze stężenie fenolu i PAH miało negatywny wpływ na stopień kolonizacji korzeni, przy czym również obserwowano pozytywny wpływ AMF na wzrost roślin. Wcześniejsze badania również wykazały szkodliwy wpływ wyższych stężeń węglowodorów alifatycznych i aromatycznych na intensywność kolonizacji mikoryzowej, rozwój arbuskul i produkcję spor, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności AMF do stymulacji wzrostu roślin (Verdin i wsp., 2006; Franco-Ramírez i wsp., 2007; Aranda i wsp., 2013; Nwoko, 2014). Stymulacja kolonizacji mikoryzowej przez umiarkowany stres, jaki w naszym przypadku stanowiło niskie stężenie fenolu i PAH, może wynikać ze zdolności adaptacyjnych badanych szczepów do rozwoju w zanieczyszczonym środowisku. Wysoka zdolność adaptacyjna AMF może wiązać się ze specyficznymi uwarunkowaniami fizjologiczno-genetycznymi, jak w przypadku *F. mosseae*, gatunku o bardzo szerokim zakresie tolerancji, pospolitego na całym świecie (Rosendahl i wsp., 2009). Innym przykładem mogą być gatunki *Glomeraceae* bytujące jałowych ekosystemach śródziemnomorskich, które wykazują wysoką tolerancję na zasolenie (Lenoir i wsp., 2016). W zależności od specyfiki środowiska i doboru symbiontów, strategią przystosowawczą AMF może być intensywniejszy wzrost ERM lub IRM. W przypadku AMF żyjących w środowisku skażonym metalami ciężkimi, obserwowano większą produkcję spor oraz

wydłużanie ERM, jako strategii obrony przed skażeniem (Pawlowska i Charvat, 2004; Cardenas-Flores i wsp., 2011; Estrada i wsp., 2013). W niniejszych badaniach obserwowano obniżenie produkcji spor i wzrost poziomu kolonizacji mikoryzowej korzeni, co zgodnie z danymi literaturowymi, mogło stanowić strategię AMF polegającą na lokacji zasobów węgla i energii w IRM. Intensywniejszy rozwój IRM obserwowano pod wpływem wielu stresów abiotycznych, np. suszy, wysokiej temperatury, wysokiej wilgotności, czy skażenia arsenem (Staddon i wsp., 2003; Bona i wsp., 2011; Wu i wsp., 2013; Lenoir i wsp., 2016). Ponadto, umiarkowany stres abiotyczny może sprzyjać lepszemu rozwojowi AM, ponieważ rośliny w niesprzyjających warunkach produkują więcej strigolaktonów, które indukują kiełkowanie spor AMF i kolonizację korzeni przez strzępkę (Mostofa i wsp., 2018).

Korzystny wpływ mikoryzy na gospodarza roślinnego w obecności stresu nie wynika jedynie z wydajniejszej podaży składników mineralnych, ale również z indukcji systemowej odpowiedzi odpornościowej u rośliny i stymulacji mechanizmów antyoksydacyjnych (Pozo i Azcón-Aguilar, 2007; Latef i wsp., 2016). Dotychczasowe badania nad wpływem węglowodorów na AM dowodzą wzrostu aktywności antyoksydacyjnej i obniżenia poziomu stresu oksydacyjnego w tkankach roślin skolonizowanych przez *R. irregularis* i *F. mosseae* (Criquet i wsp., 2000; Debiante i wsp., 2009; Lenoir i wsp., 2016), na czym oparto postawioną hipotezę. Wykazano również wzrost poziomu stresu oksydacyjnego w mycelium *R. irregularis* pod wpływem antracenu i benzopirenu (Debiante i wsp., 2008, 2009). Jednakże, brakuje w literaturze informacji na temat aktywności enzymów antyoksydacyjnych u AMF. Badając w przeprowadzonym eksperymencie poziom stresu oksydacyjnego i aktywność enzymatyczną, zarówno w tkankach roślinnych, jak i w sporach AMF, nie uzyskano jednoznacznych wyników. Funkcjonowanie mechanizmów antyoksydacyjnych u gospodarza roślinnego i symbionta grzybowego może być bardziej skomplikowane i różnić się w zależności od gatunku AMF. Zauważono odwrotną korelację pomiędzy poziomem aktywności antyoksydacyjnej w sporach AMF i w tkankach roślinnych. W przypadku *F. caledonium*, aktywność antyoksydacyjna w sporach AMF zwiększyła się wraz ze wzrostem stężenia fenolu i PAH, przy jednoczesnym spadku aktywności antyoksydacyjnej w tkankach roślinnych. Z drugiej strony, kolonizacji korzeni przez *D. varaderana* towarzyszył spadek aktywności enzymów w sporach i wzrost aktywności antyoksydacyjnej w roślinie. W sporach *C. walkeri* nie zaobserwowano jednoznacznego trendu w zmianach aktywności antyoksydacyjnej w odpowiedzi na zanieczyszczenie, przy czym nie obserwowano go również w tkankach roślin

skolonizowanych przez ten gatunek AMF. Zatem, obecność mikoryzy nie zawsze wiąże się z aktywacją mechanizmów antyoksydacyjnych, lecz może ona mieć zdolność do regulowania tej aktywności u roślin. Możliwe, iż wysoka aktywność enzymów antyoksydacyjnych w sporach AMF, a co za tym idzie, najprawdopodobniej i w IRM, wspomaga roślinę w procesie unieszkodliwiania reaktywnych form tlenu, przez co odpowiedź rośliny na stres może być łagodniejsza. Niestety, przeprowadzony eksperyment nie wykazał, że wiązało się to jednoznacznie ze spadkiem poziomu stresu oksydacyjnego w roślinie. Poziom peroksydacji lipidów w liściach, w obecności skażenia, został obniżony we wszystkich kulturach mikoryzowych, natomiast poziom oksydacji DNA został obniżony jedynie w przypadku zastosowania trójgatunkowego inokulum mikoryzowego. W sporach AMF, wzrost aktywności antyoksydacyjnej również nie wiązał się z obniżeniem parametrów stresu oksydacyjnego.

6. Wnioski

1. Zanieczyszczenie gleby fenolem i PAH miało negatywny wpływ na kolonizację mikoryzową korzeni *P. trivialis* i *Ph. australis*, biomasę i rozwój AMF w glebie oraz bioróżnorodność społeczności AMF w glebie i w korzeniach roślin.
2. Społeczności AMF w glebie okołokorzeniowej i korzeniach *Ph. australis* i *P. trivialis* na terenie zanieczyszczonym fenolem i PAH, były silnie zdominowane przez AMF z rodzajów *Paraglomus*, *Funneliformis*, *Rhizophagus* i *Claroideoglomus*; natomiast, na terenie zanieczyszczonym, przez AMF z rodzajów *Archaeospora*, *Paraglomus*, *Rhizophagus* i *Dominikia*.
3. Zanieczyszczenie środowiska fenolem i PAH nie miało istotnego wpływu na ogólną biomasę mikroorganizmów glebowych. Jednakże, w glebie okołokorzeniowej *Ph. australis* obserwowano zmiany w strukturze zespołów mikroorganizmów.
4. AMF wyizolowane w kulturach pułapkowych nie były gatunkami dominującymi w społecznościach charakterystycznych dla badanych terenów i gatunków roślin.
5. Inokulacja *L. perenne* pojedynczymi gatunkami AMF (*F. caledonium*, *D. varaderana*, *C. walkeri*) wpłynęła pozytywnie na wzrost roślin, bez względu na poziom skażenia podłoża fenolem i PAH. Inokulacja *L. perenne* trzema gatunkami AMF jednocześnie wpłynęła negatywnie na wzrost i biomasę roślin rosnących w podłożu o niskim stopniu skażenia fenolem i PAH oraz w podłożu nieskażonym.
6. Gatunkiem AMF o największym potencjale do wspomagania wzrostu roślin narażonych na działanie fenolu i PAH był *F. caledonium*.
7. Poziom aktywności enzymów antyoksydacyjnych w sporach AMF był odwrotnie skorelowany z poziomem aktywności tych enzymów w tkankach *L. perenne*. Jednakże, inokulacja mikoryzowa nie miała jednoznacznego wpływu na poziom stresu oksydacyjnego w tkankach *L. perenne* rosnących w podłożu skażonym fenolem i PAH.
8. Wysokie stężenie fenolu i PAH (30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹) miało negatywny wpływ zarówno na rozwój AMF w korzeniach, jak i produkcję spor oraz poziom stresu oksydacyjnego w sporach AMF. Niskie (5/20 mg fenolu/PAH kg⁻¹) i umiarkowane (15/60 mg fenolu/PAH kg⁻¹) stężenie fenolu i PAH w podłożu stymulowało kolonizację mikoryzową oraz obniżyło produkcję spor w kulturach inokulowanych pojedynczymi gatunkami AMF.

7. Streszczenie

Arbuskularne grzyby mikoryzowe (AMF – ang. arbuscular mycorrhizal fungi) są obligatoryjnymi symbiontami większości znanych gatunków roślin. W zamian za węgiel asymilowany w procesie fotosyntezy, dostarczają roślinom składników mineralnych, wspomagając ich wzrost i przeżywalność, również pod wpływem stresu. Pozytywnym wpływem AMF na rośliny zainteresowano się w badaniach nad wspomaganiem fitoremediacji gleb zanieczyszczonych węglowodorami, wykazując synergistyczne działanie pomiędzy AMF, gospodarzem roślinnym i bakteriami degradującymi węglowodory.

Celem pracy była charakterystyka bioróżnorodności i rozwoju AMF w korzeniach i glebie okołokorzeniowej *Ph. australis* i *P. trivialis* rosnących w środowisku zanieczyszczonym fenolem i wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi (PAH) oraz w środowisku niezanieczyszczonym, ocena biomasy pozostałych grup mikroorganizmów glebowych, a także zbadanie potencjału AMF wyizolowanych z zanieczyszczonego terenu we wspomaganiu wzrostu *Lolium perenne* w warunkach skażenia fenolem i PAH.

Ocenę rozwoju AMF w badanych środowiskach oparto na określeniu kolonizacji mikoryzowej korzeni, liczbie kopii genu SSU rDNA w korzeniach, długości mycelium zewnątrzkorzeniowego, ilości wytworzonych spor oraz na stężeniach białek spokrewnionych z glomalinami i kwasu tłuszczowego 16:1 ω 5c w glebie. Biomase głównych grup mikroorganizmów glebowych oszacowano na podstawie zawartości markerowych fosfolipidowych kwasów tłuszczowych w glebie. Charakterystykę bioróżnorodności społeczności AMF oparto na profilach DGGE (ang. denaturing gradient gel electrophoresis) genu SSU rDNA oraz na sekwencjonowaniu nowej generacji bibliotek metagenomowych genu LSU rDNA. Izolację AMF ze środowiska przeprowadzono metodą kultur pułapkowych, identyfikując wyizolowane szczepy do gatunku na podstawie sekwencji genów SSU rDNA – ITS – LSU rDNA. Wyizolowane ze środowiska zanieczyszczonego AMF, *Funneliformis caledonium*, *Claroideoglossus walkeri* i *Diversispora varaderana*, wprowadzono jako jednogatunkowe lub wielogatunkowe inokula do podłoża skażonego mieszanką fenolu i PAH w stężeniach: 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg fenolu/PAH kg⁻¹, które obsadzono życicą trwałą. Rozwój mikoryzy w założonych układach badawczych oceniono na podstawie kolonizacji mikoryzowej korzeni oraz ilości

spor w podłożu. W wyizolowanych sporach AMF zbadano poziom stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych. Wpływ AMF na wzrost roślin oszacowano, analizując wysokość pędów oraz biomasę pędów i korzeni *Lolium perenne*, a także poziom stresu oksydacyjnego i aktywności enzymów antyoksydacyjnych w tkankach roślin.

Zanieczyszczenie gleby fenolem i PAH miało negatywny wpływ na kolonizację korzeni roślin, biomasę AMF w glebie oraz bioróżnorodność społeczności AMF, szczególnie tych związanych z *Ph. australis*. Nie wykazano istotnych różnic w bioróżnorodności i strukturze społeczności AMF pomiędzy glebą i korzeniami. Głównym czynnikiem kształtującym strukturę gatunkową społeczności AMF było zanieczyszczenie gleby. Gatunek gospodarza roślinnego wpływał istotnie na strukturę gatunkową społeczności AMF jedynie na terenie niezanieczyszczonym. W obu środowiskach stwierdzono silną dominację AMF z rodziny *Paraglomeraceae*. Poza tym, społeczności AMF na terenie zanieczyszczonym były zdominowane przez AMF z rodzajów *Funneliformis*, *Rhizophagus* i *Claroideoglossum*, uważanych za organizmy ruderalne i tolerujące stres. Poza rodziną *Paraglomeraceae*, w społecznościach AMF na terenie niezanieczyszczonym dominowały grzyby z rodziny *Archaeosporaceae* i rzadziej identyfikowane AMF z rodziny *Glomeraceae*, jak np. *Dominikia* sp., obecne w środowiskach niezdominowanych przez AMF ruderalne.

Zanieczyszczenie gleby fenolem i PAH nie miało istotnego wpływu na ogólną biomasę mikroorganizmów glebowych. Biomasa badanych grup mikroorganizmów zależała od interakcji pomiędzy glebą z badanego terenu a gatunkiem rośliny. W glebie okołokorzeniowej *P. trivialis* nie znaleziono różnic w biomasie grzybów saprofitycznych i głównych grup bakterii pomiędzy badanymi terenami. Natomiast, gleba wokół korzeni *Ph. australis* na terenie zanieczyszczonym charakteryzowała się większą biomasą bakterii Gram-dodatnich, promieniowców i grzybów saprofitycznych, w porównaniu do gleby niezanieczyszczonej. Promieniowce, poza fenolem i PAH, mogły być kolejnym czynnikiem wpływającym supresyjnie na rozwój AMF, ponieważ stwierdzono negatywną korelację pomiędzy ich biomasą a biomasą AMF w glebie.

W kulturach pułapkowych wyizolowano gatunki AMF, które poza *Dominikia* sp., nie były gatunkami dominującymi w badanych społecznościach. Spory w warunkach laboratoryjnych zostały wytworzone przez gatunki AMF, których udział w badanych społecznościach był marginalny. *Funneliformis caledonum*, *Diversispora varaderoana* i *Claroideoglossum walkeri* wyizolowane z terenu zanieczyszczonego, zastosowano jako

inokula w badaniach nad wpływem fenolu i PAH na rozwój AMF i *L. perenne*. Rośliny zaszczone jednogatunkowym inokulum mikoryzowym charakteryzowały się lepszym wzrostem i biomasa, bez względu na poziom zanieczyszczenia, w porównaniu do roślin zaszczone inokulum wielogatunkowym, gdzie obserwowano pasożytniczą interakcję pomiędzy *L. perenne* i *C. walkeri*. Pomimo pozytywnego wpływu na wzrost roślin, inokulacja AMF nie przyczyniła się do podwyższenia aktywności enzymów antyoksydacyjnych i obniżenia poziomu stresu oksydacyjnego w tkankach roślinnych. Pod wpływem niskiego i średniego poziomu skażenia obserwowano alokację biomasy AMF do mycelium wewnątrzkorzeniowego. Wyższe stężenie fenolu i PAH miało negatywny wpływ na kolonizację mikoryzową korzeni, liczbę spor i poziom stresu oksydacyjnego w sporach AMF.

Przedstawiona praca daje podstawę do dalszych badań aplikacyjnych nad zastosowaniem natywnych szczepów AMF i współpracujących z nimi mikroorganizmów we wspomaganiu fitoremediacji gleb zanieczyszczonych toksycznymi związkami organicznymi.

8. Summary

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) are the obligatory symbionts of most known plant species. In exchange for the photosynthetically assimilated carbon, they provide a host plant with mineral nutrients and stimulate its growth and viability, also under stress conditions. The positive influence of AMF on plants have gained much interest in the field of research on phytoremediation of soils contaminated with hydrocarbons, showing synergetic interactions between AMF, a plant host and hydrocarbon-degrading bacteria.

The aims of this study were to: characterize the biodiversity and development of AMF in roots and soil associated with *Ph. australis* and *P. trivialis* growing in the environment contaminated with phenol and polynuclear hydrocarbons (PAHs) and in the uncontaminated environment evaluate the biomass of other groups of soil microorganisms, assess the potential of AMF species isolated from the contaminated site in enhancing the growth of *Lolium perenne* in the presence of phenol and PAHs.

AMF development in the studied environments was evaluated on the basis of the mycorrhizal colonization of roots, the number of SSU rDNA gene copies in roots, the length of extramatrical mycelium, the number of AMF spores, the concentrations of glomalin-related soil proteins and marker neutral fatty acid 16:1 ω 5c in soil. Biomass of the main groups of soil microorganisms was evaluated by the analysis of the content of marker phospholipid fatty acids in soil. The biodiversity of AMF communities was analyzed based on the DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) profiles of SSU rDNA gene and the next generation sequencing of LSU rDNA metagenomic libraries. Isolation of AMF from environmental samples was performed using trap cultures. Isolated AMF strains were affiliated to species based on the sequence of SSU rDNA – ITS – LSU rDNA genes. AMF species isolated from the contaminated environment: *Funneliformis caledonium*, *Claroideoglomus walkeri* and *Diversispora varaderana*, were used as single-species and multi-species inocula in *L. perenne* cultures contaminated with the mixture of phenol and PAHs. Final concentrations of the contaminants in culture medium were : 0/0, 5/20, 15/60, 30/120 mg phenol/PAHs kg⁻¹. Development of mycorrhiza in the cultures was evaluated by the assessment of mycorrhizal root colonization and the number of AMF spores. Isolated spores were used for the analysis of oxidative stress and the activity of antioxidative enzymes in AMF. The effect of AMF on plant growth was evaluated on the basis of shoot height, root

and shoot biomass, the level of oxidative stress and the activity of antioxidative enzymes in plant tissues.

Soil contamination with phenol and PAHs had a negative effect on mycorrhizal root colonization, AMF biomass in soil and the biodiversity of AMF communities, especially those associated with *Ph. australis*. There were no significant differences between the biodiversity and structure of AMF communities in roots and soil. Soil contamination was identified as the main factor affecting the species structure of AMF communities. Host plant species had a significant effect on the structure of AMF communities only in the uncontaminated site. In both studied environments, a strong domination of AMF assigned to the family *Paraglomeraceae* was revealed. Moreover, AMF communities in the contaminated site were dominated by genera *Funneliformis*, *Rhizophagus* and *Claroideoglossum*, described previously as ruderal and stress tolerant AMF. Beside the family *Paraglomeraceae*, other AMF which dominated in the communities associated with the uncontaminated site represented the genus *Archaeosporaceae* and rarely identified AMF from the family *Glomeraceae*, eg. *Dominikia* sp., found previously in the environments undominated by ruderal AMF.

Soil contamination with phenol and PAHs had no significant influence on the total biomass of soil microorganisms. Biomass of the main groups of soil microorganisms depended on the interaction between the studied site and the host plant species. There were no significant differences, in the biomass of saprophytic fungi and the main groups of bacteria associated with *P. trivialis* between both studied sites. On the other hand, the contaminated soil associated with *Ph. australis* was characterized by a higher biomass of Gram-positive bacteria and actinobacteria, compared to the uncontaminated soil. Beside phenol and PAHs, actinobacteria might be another factor which suppressed the development of AMF, because their biomass was negatively correlated with the biomass of AMF in soil.

Excluding *Dominikia* sp., AMF isolated in trap cultures did not represent dominant species which defined the studied AMF communities. Spores in the laboratory conditions were produced by AMF species which relative abundance in the studied communities was marginal. *Funneliformis caledonium*, *Diversispora varaderoana* and *Claroideoglossum walkeri*, isolated from the contaminated site, were used as inocula in the study on the effect of phenol and PAHs on the development of AMF and *L. perenne*. Plants inoculated with single AMF species reached higher growth and biomass, regardless of the concentration of contaminants, compared to plants inoculated with the mixture of AMF species, where

a parasitic interaction between *L. perenne* and *C. walkeri* was observed. Although the mycorrhizal inoculation had a positive effect on plant growth, it did not contribute to a higher activity of antioxidative enzymes and a lower level of oxidative stress in plant tissues. AMF response to low and medium contamination with phenol and PAHs was the allocation of biomass to intraradical mycelium. High concentration of phenol and PAHs had a negative effect on mycorrhizal root colonization, production of spores and the level of oxidative stress in AMF spores.

The presented results constitute a firm background for further application research on the potential of native AMF strains and microorganisms cooperating with them in the enhancement of phytoremediation of soils contaminated with toxic organic substances.

9. Literatura

- Acho A., 2019. Asbio: a collection of statistical tools for biologists. R Package Version 1.5-5. <https://CRAN.R-project.org/package=asbio>.
- Abdel Latef A.A.H., Chaoxing H., 2014. Does inoculation with *Glomus mosseae* improve salt tolerance in pepper plants? J. Plant Growth Regul. 3, 644-653. DOI: 10.1007/s00344-014-9414-4
- Aguilar-Trigueros C.A., Hempel S., Powell J.R., Cornwell W.K., Rillig M.C., 2019. Bridging reproductive and microbial ecology: a case study in arbuscular mycorrhizal fungi. ISME J. 13, 873-884. DOI: 10.1038/s41396-018-0314-7
- Ait Lahmidi N., Courty P.E., Brulé D., Chatagnier O., Arnould C., Doidy J., Berta G., Lingua G., Wipf D., Bonneau L., 2016. Sugar exchanges in arbuscular mycorrhiza: RiMST5 and RiMST6, two novel *Rhizophagus irregularis* monosaccharide transporters, are involved in both sugar uptake from the soil and from the plant partner. Plant Physiol. Biochem. 107, 354-363. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.06.023
- Alarcón A., Davies F.T., Autenrieth R.L., Reed D.W., Zuberer D.A., 2006a. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons with a *Lolium multiflorum*–*Glomus intraradices*–inorganic fertilization system: influence on plant growth, antioxidant activity, microbial respiration, and hydrocarbon degradation. HortScience. 41, 1059. DOI: 10.21273/hortsci.41.4.1059c
- Alarcón A., Davies F.T., Autenrieth R.L., Zuberer D.A., 2008. Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. Int. J. Phytoremediation. 10, 251-263. DOI: 10.1080/15226510802096002
- Alarcón A., Delgadillo-Martínez J., Franco-Ramírez A., Davies F.T., Ferrera-Cerrato R., 2006b. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita*–*Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. Rev. Int. Contam. Ambient. 22, 39-47
- Alkan N., Gadkar V., Yarden Q., Kapulnik Y., 2006. Analysis of quantitative interactions between two species of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glomus mosseae* and *G. intraradices*, by real-time PCR. Appl. Environ. Microbiol. 72, 4192-4199. DOI: 10.1128/AEM.02889-05
- Amballa H., Bhumi N.R., 2017. Significance of arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere microflora in plant growth and nutrition. W: D.K. Choudhary, A. Varma A., N. Tuteja (red.), Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture. Springer, Singapur. DOI: 10.1007/978-981-10-2854-0_19
- Aranda E., Scervino J.M., Godoy P., Reina R., Ocampo J.A., Wittich R.M., García-Romera I., 2013. Role of arbuscular mycorrhizal fungus in the dissipation of PAHs under root-

- organ culture conditions. Environ. Pollut. 181, 182-189. *Rhizophagus custos* DOI: 10.1016/j.envpol.2013.06.034
- Augé R.M., Toler H.D., Saxton A.M., 2014. Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. Mycorrhiza 25: 13-24. DOI: 10.1007/s00572-014-0585-4
- Avio L., Pellegrino E., Bonari E., Giovannetti M., 2006. Functional diversity of arbuscular mycorrhizal fungal isolates in relation to extraradical mycelial networks. New Phytol. 172, 347-357. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01839.x
- Bago B., Bécard G., 2002. Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi W: S. Gianinazzi, H. Schüepp, J.M. Barea, K. Haselwandter (red.), Mycorrhizal Technology in Agriculture, s. 33-48. Birkhäuser, Bazylea, Szwajcaria. DOI: 10.1007/978-3-0348-8117-3_3
- Bago B., Pfeffer P.E., Abubaker J., Jun J., Allen J.W., Brouillette J., Douds D.D., Lammers P.J., Shachar-Hill Y., 2003. Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. Plant Physiol. 131, 1496-1507. DOI: 10.1104/pp.102.007765
- Balestrini R., Magurno F., Walker C., Lumini E., Bianciotto V., 2010. Cohorts of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) in *Vitis vinifera*, a typical Mediterranean fruit crop. Environ. Microbiol. Rep. 2, 594-604. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2010.00160.x
- Baltruschat H., Santo, V.M., da Silva D.K.A., Schellenberg I., Deubel A., Sieverding E., Oehl F., 2019. Unexpectedly high diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in fertile Chernozem croplands in Central Europe. Catena. 182, 104135. DOI: 10.1016/j.catena.2019.104135
- Balzerque C., Chabaud M., Barker D.G., Bécard G., Rochange S.F., 2013. High phosphate reduces host ability to develop arbuscular mycorrhizal symbiosis without affecting root calcium spiking responses to the fungus. Front. Plant Sci. 4, 426. DOI: 10.3389/fpls.2013.00426
- Bárzana G., Aroca R., Paz J.A., Chaumont F., Martinez-Ballesta M.C., Carvajal M., Ruiz-Lozano J.M., 2012. Arbuscular mycorrhizal symbiosis increases relative apoplastic water flow in roots of the host plant under both well-watered and drought stress conditions. Ann. Bot. 109, 1009-1017. DOI: 10.1093/aob/mcs007
- Bedini S., Avio L., Argese E., Giovannetti M., 2007. Effects of long-term land use on arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein. Agric. Ecosyst. Environ. 120, 463-466. DOI: 10.1016/j.agee.2006.09.010
- Benizri E., Baudoin E., Guckert A., 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. Biocontrol Sci. Technol. 11, 557-574. DOI: 10.1080/09583150120076120
- Besserer A., Puech-Pagès V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., Roy S., Portais J.C.,

- Roux C., Bécard G., Séjalon-Delmas N., 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.* 4: e226. DOI: 10.1371/journal.pbio.0040226
- Binet P., Portal J.M., Leyval C., 2000. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant Soil.* 227, 207-213. DOI: 10.1023/A:1026587418611
- Bitterlich M., Rouphael Y., Graefe J., Franken P., 2018. Arbuscular mycorrhizas: a promising component of plant production systems provided favorable conditions for their growth. *Front. Plant Sci.* 9, 1329. DOI: 10.3389/fpls.2018.01329
- Blanke V., Renker C., Wagner M., Füllner K., Held M., Kuhn A.J., Buscot F., 2005. Nitrogen supply affects arbuscular mycorrhizal colonization of *Artemisia vulgaris* in a phosphate-polluted field site. *New Phytol.* 166, 981-92. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01374.x
- Błaszowski J., Chwat G., Góralska A., Ryszka P., Kovács G.M., 2015a. Two new genera, *Dominikia* and *Kamienskia*, and *D. disticha* sp. nov. in *Glomeromycota*. *Nov. Hedwigia.* 100, 225-238. DOI: 10.1127/nova_hedwigia/2014/0216
- Błaszowski J., Czerniawska B., Wubet T., Schäfer T., Buscot F., Renker C., 2008. *Glomus irregulare*, a new arbuscular mycorrhizal fungus in the *Glomeromycota*. *Mycotaxon* 106, 247-267
- Błaszowski J., Furrázola E., Chwat G., Góralska A., Lukács A.F., Kovács G.M., 2015b. Three new arbuscular mycorrhizal *Diversispora* species in *Glomeromycota*. *Mycol. Prog.* 14, 105. DOI: 10.1007/s11557-015-1122-3
- Błaszowski J., Renker C., Buscot F., 2006. *Glomus drummondii* and *G. walkeri*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycol. Res.* 110, 555-566. DOI: 10.1016/j.mycres.2006.02.006
- Bona E., Marsano F., Massa N., Cattaneo C., Cesaro P., Argese E., di Toppi L.S., Cavaletto M., Berta G., 2011. Proteomic analysis as a tool for investigating arsenic stress in *Pteris vittata* roots colonized or not by arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Proteomics.* 74, 1338-1350. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.03.027
- Bonfante P., Genre A., 2008. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. *Trends Plant Sci.* 13, 492-498. DOI: 10.1016/j.tplants.2008.07.001
- Boughner L.A., Singh P., 2016. Microbial Ecology: Where are we now? *Postdoc J.* 4, 3-17. DOI: 10.14304/surya.jpr.v4n11.2
- Bradford M.M., 1976. a rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3

- Bravo A., York T., Pumplin N., Mueller L.A., Harrison M.J., 2016. Genes conserved for arbuscular mycorrhizal symbiosis identified through phylogenomics. *Nat. Plants* 2, 15208. DOI: 10.1038/NPLANTS.2015.208
- Breuillin-Sessoms F., Floss D.S., Karen Gomez S., Pumplin N., Ding Y., Levesque-Tremblay V., Noar R.D., Daniels D.A., Bravo A., Eaglesham J.B., Benedito V.A., Udvardi M.K., Harrison M.J., 2015. Suppression of arbuscule degeneration in *Medicago truncatula* phosphate transporter4 mutants is dependent on the ammonium transporter 2 family protein AMT2;3. *Plant Cell* 27, 1352-1366. DOI: 10.1105/tpc.114.131144
- Breuillin F., Schramm J., Hajirezaei M., Ahkami A., Favre P., Druege U., Hause B., Bucher M., Kretzschmar T., Bossolini E., Kuhlmeier C., Martinoia E., Franken P., Scholz U., Reinhardt D., 2010. Phosphate systemically inhibits development of arbuscular mycorrhiza in *Petunia hybrida* and represses genes involved in mycorrhizal functioning. *Plant J.* 64, 1002-1017. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2010.04385.x
- Brundrett M., Melville L., Peterson L., 1994. Practical methods in mycorrhiza research: based on a workshop organized in conjunction with the Ninth North American Conference on Mycorrhizae, Uniwersytet w Guelph, Guelph, Ontario, Canada. Mycologue Publications, Sidney, Kanada.
- Brundrett M.C., Tedersoo L., 2018. Evolutionary history of mycorrhizal symbioses and global host plant diversity. *New Phytol.* 220, 1108-1115. DOI: 10.1111/nph.14976
- Brunner E., Dette H., Munk A., 1997. Box-type approximations in nonparametric factorial designs. *J. Am. Stat. Assoc.* 92, 1494-1502. DOI: 10.2307/2965420
- Cabello M.N., 1999. Effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) isolated from hydrocarbon polluted soils. *J. Basic Microbiol.* 39, 89-95. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4028(199905)39:2<89::AID-JOBM89>3.0.CO;2-D
- Cabello M.N., 1997. Hydrocarbon pollution: Its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 233-236. DOI: 10.1016/S0168-6496(96)00094-3
- Calabrese S., Pérez-Tienda J., Ellerbeck M., Arnould C., Chatagnier O., Boller T., Schüßler A., Brachmann A., Wipf D., Ferrol N., Courty P.E., 2016. GintAMT3-a low-affinity ammonium transporter of the arbuscular mycorrhizal rhizophagus *irregularis*. *Front. Plant Sci.* 25, 679. DOI: 10.3389/fpls.2016.00679
- Calonne M., Fontaine J., Debiante D., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A., 2014a. The arbuscular mycorrhizal *Rhizophagus irregularis* activates storage lipid biosynthesis to cope with the benzo[a]pyrene oxidative stress. *Phytochemistry* 97, 30-37. DOI: 10.1016/j.phytochem.2013.10.014
- Calonne M., Fontaine J., Tisserant B., de Boulois H.D., Grandmougin-Ferjani A., Declerck S., Lounès-Hadj Sahraoui A., 2014b. Polyaromatic hydrocarbons impair phosphorus transport by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. *Chemosphere*

- 104, 97-104. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.10.070
- Cardenas-Flores A., Cranenbrouck S., Draye X., Guillet A., Govaerts B., Declerck S., 2011. The sterol biosynthesis inhibitor molecule fenhexamid impacts the vegetative compatibility of *Glomus clarum*. *Mycorrhiza* 21, 443-449. DOI: 10.1007/s00572-011-0385-z
- Chagnon P.L., Bradley R.L., Maherali H., Klironomos J.N., 2013. a trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends Plant Sci.* 18, 484-491. DOI: 10.1016/j.tplants.2013.05.001
- Charpentier M., Sun J., Martins T.V., Radhakrishnan G. V., Findlay K., Soumpourou E., Thouin J., Véry A.A., Sanders D., Morris R.J., Oldroyd G.E.D., 2016. Nuclear-localized cyclic nucleotide-gated channels mediate symbiotic calcium oscillations. *Science* 352, 1102-1105. DOI: 10.1126/science.aae0109
- Chen S., Jin W., Liu A., Zhang S., Liu D., Wang F., Lin X., He C., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increase growth and secondary metabolism in cucumber subjected to low temperature stress. *Sci. Hortic.* 160, 222-229. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.05.039
- Cheung K.C., Zhang J.Y., Deng H.H., Ou Y.K., Leung H.M., Wu S.C., Wong M.H., 2008. Interaction of higher plant (jute), electrofused bacteria and mycorrhiza on anthracene biodegradation. *Bioresour. Technol.* 99, 2148-2155. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.05.037
- Corgié S.C., Fons F., Beguiristain T., Leyval C., 2006. Biodegradation of phenanthrene, spatial distribution of bacterial populations and dioxygenase expression in the mycorrhizosphere of *Lolium perenne* inoculated with *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*. 16, 207-212. DOI: 10.1007/s00572-006-0049-6
- Cornejo P., Azcón-Aguilar C., Miguel Barea J., Ferrol N., 2004. Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) as a tool for the characterization of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 241, 265-270. DOI: 10.1016/j.femsle.2004.10.030
- Corradi N., Bonfante P., 2012. The arbuscular mycorrhizal symbiosis: origin and evolution of a beneficial plant infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002600. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002600
- Criquet S., Joner E., Leglize P., Leyval C., 2000. Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnol. Lett.* 22, 1733-1737. DOI: 10.1023/A:1005604719909
- Crossay T., Antheaume C., Redecker D., Bon L., Chedri N., Richert C., Guentas L., Cavaloc Y., Amir H., 2017. New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using AMLDI-TOF-MS. *Sci. Rep.* 7, 14306. DOI: 10.1038/s41598-017-14487-6

- Daniels B., Skipper H., 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. W: N.C. Schenck (red.), Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, Stany Zjednoczone
- Davison J., Öpik M., Daniell T.J., Moora M., Zobel M., 2011. Arbuscular mycorrhizal fungal communities in plant roots are not random assemblages. FEMS Microbiol. Ecol. 78, 103-115. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01103.x
- La Providencia I.E. de, Souza F.A. de, Fernández F., Delmas N.S., Declerck S., 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi reveal distinct patterns of anastomosis formation and hyphal healing mechanisms between different phylogenetic groups. New Phytol. 165, 261-271. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01236.x
- La Providencia I.E. de, Stefani F.O.P., Labridy M., St-Arnaud M., Hijri M., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungal diversity associated with *Eleocharis obtusa* and *Panicum capillare* growing in an extreme petroleum hydrocarbon-polluted sedimentation basin. FEMS Microbiol. Lett. 362, fnv081. DOI: 10.1093/femsle/fnv081
- Debiane D., Calonne M., Fontaine J., Laruelle F., Grandmougin-Ferjani A., Lounes-Hadj Sahraoui A., 2011. Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. Fungal Biol. 115, 782-792. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.06.003
- Debiane D., Garçon G., Verdin A., Fontaine J., Durand R., Grandmougin-Ferjani A., Shirali P., Sahraoui A.L.H., 2008. *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. Environ. Exp. Bot. 64, 120-127. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2008.04.003
- Debiane D., Garçon G., Verdin A., Fontaine J., Durand R., Shirali P., Grandmougin-Ferjani A., Lounès-Hadj Sahraoui A., 2009. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. Phytochemistry 70, 1421-1427. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.07.002
- Di Gregorio S., Gentini A., Siracusa G., Becarelli S., Azaizah H., Lorenzi R., 2014. Phytomediated biostimulation of the autochthonous bacterial community for the acceleration of the depletion of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated sediments. Biomed Res. Int. 891630. DOI: 10.1155/2014/891630
- Doidy J., Van Tuinen D., Lamotte O., Corneillat M., Alcaraz G., Wipf D., 2012. The *Medicago truncatula* sucrose transporter family: characterization and implication of key members in carbon partitioning towards arbuscular mycorrhizal fungi. Mol. Plant 5, 1346-1358. DOI: 10.1093/mp/sss079
- Dreyer B., Honrubia M., Morte A., 2014. How root structure defines the arbuscular mycorrhizal symbiosis and what we can learn from it? W: A. Morte, A. Varma (red.), Root engineering. Soil biology, tom 40, s. 145-169. Springer, Berlin, Heidelberg, Niemcy. DOI: 10.1007/978-3-642-54276-3_7

- Duc N.H., Csintalan Z., Posta K., 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi mitigate negative effects of combined drought and heat stress on tomato plants. *Plant Physiol. Biochem.* 132, 297-307. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.09.011
- Estrada B., Barea J.M., Aroca R., Ruiz-Lozano J.M., 2013. a native *Glomus intraradices* strain from a Mediterranean saline area exhibits salt tolerance and enhanced symbiotic efficiency with maize plants under salt stress conditions. *Plant Soil* 366, 333-349. DOI: 10.1007/s11104-012-1409-y
- Evelin H., Giri B., Kapoor R., 2012. Contribution of *Glomus intraradices* inoculation to nutrient acquisition and mitigation of ionic imbalance in NaCl-stressed *Trigonella foenum-graecum*. *Mycorrhiza* 22, 203-217. DOI: 10.1007/s00572-011-0392-0
- Fellbaum C.R., Gachomo E.W., Beesetty Y., Choudhari S., Strahan G.D., Pfeffer P.E., Kiers E.T., Bücking H., 2012. Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *PNAS USA* 109, 2666-2671. DOI: 10.1073/pnas.1118650109
- Fellbaum C.R., Mensah J.A., Cloos A.J., Strahan G.E., Pfeffer P.E., Kiers E.T., Bücking H., 2014. Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. *New Phytol.* 203, 646-656. DOI: 10.1111/nph.12827
- Fester T., 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi in a wetland constructed for benzene-, methyl tert-butyl ether- and ammonia-contaminated groundwater bioremediation. *Microb. Biotechnol.* 6, 80-84. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2012.00357.x
- Finlay R.D., 2008. Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *J. Exp. Bot.* 59, 1115-1126. DOI: 10.1093/jxb/ern059
- Fitter A.H., 2005. Darkness visible: reflections on underground ecology. *J. Ecol.* 93, 231-243. DOI: 10.1111/j.0022-0477.2005.00990.x
- Fitzpatrick C.R., Copeland J., Wang P.W., Guttman D.S., Kotanen P.M., Johnson M.T.J., 2018. Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *PNAS USA* 115, 1157-1165. DOI: 10.1073/pnas.1717617115
- Floss D.S., Gomez S.K., Park H.J., MacLean A.M., Müller L.M., Bhattarai K.K., Lévesque-Tremblay V., Maldonado-Mendoza I.E., Harrison M.J., 2017. a transcriptional program for arbuscule degeneration during AM symbiosis is regulated by MYB1. *Curr. Biol.* 27, 1206-1212. DOI: 10.1016/j.cub.2017.03.003
- Franco-Ramírez A., Ferrera-Cerrato R., Varela-Fregoso L., Pérez-Moreno J., Alarcón A., 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum-contaminated soils in Mexico and the effects of petroleum hydrocarbons on spore germination. *J. Basic Microbiol.* 47, 378-383. DOI: 10.1002/jobm.200610293
- Frey B., Schüepp H., 1993. Acquisition of nitrogen by external hyphae of arbuscular

- mycorrhizal fungi associated with *Zea mays* L. New Phytol. 124, 221-230. DOI: 10.1111/j.1469-8137.1993.tb03811.x
- Friede M., Unger S., Hellmann C., Beyschlag W., 2016. Conditions promoting mycorrhizal parasitism are of minor importance for competitive interactions in two differentially mycotrophic species. Front. Plant Sci. 7, 1465. DOI: 10.3389/fpls.2016.01465
- Frostegård A., Tunlid A., Baath E., 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3605-3617. DOI: 10.1128/aem.59.11.3605-3617.1993
- Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E., 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. Soil Biol. Biochem. 43, 1621-1625. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.11.021
- Gadkar V., Rillig M.C., 2006. The arbuscular mycorrhizal fungal protein glomalin is a putative homolog of heat shock protein 60. FEMS Microbiol. Lett. 263, 93-101. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2006.00412.x
- Gamalero E., Berta G., Massa N., Glick B.R., Lingua G., 2010. Interactions between *Pseudomonas putida* UW4 and *Gigaspora rosea* BEG9 and their consequences for the growth of cucumber under salt-stress conditions. J. Appl. Microbiol. 108, 236-245. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04414.x
- Gan S., Lau E.V., Ng H.K., 2009. Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). J. Hazard. Mater. 172, 532-549. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.118
- Gao Y., Cheng Z., Ling W., Huang J., 2010. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae contribute to the uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by plant roots. Bioresour. Technol. 101, 6895-6901. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.03.122
- Gao Y., Li Q., Ling W., Zhu X., 2011. Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. J. Hazard. Mater. 185, 703-709. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.09.076
- Garcés-Ruiz M., Senés-Guerrero C., Declerck S., Cranenbrouck S., 2019. Community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with native plants growing in a petroleum-polluted soil of the Amazon region of Ecuador. MicrobiologyOpen 8, e703. DOI: 10.1002/mbo3.703
- Garcés-Ruiz M., Senés-Guerrero C., Declerck S., Cranenbrouck S., 2017. Arbuscular mycorrhizal fungal community composition in *Carludovica palmata*, *Costus scaber* and *Euterpe precatoria* from weathered oil ponds in the Ecuadorian Amazon. Front. Microbiol. 8, 2134. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02134
- Garcia K., Chasman D., Roy S., Ané J.M., 2017. Physiological responses and gene co-expression network of mycorrhizal roots under K+deprivation. Plant Physiol. 173, 1811-1823. DOI: 10.1104/pp.16.01959

- Gaspar M.L., Cabello M.N., Cazau M.C., Pollero R.J., 2002. Effect of phenanthrene and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots. *Mycorrhiza* 12, 55-59. DOI: 10.1007/s00572-001-0147-4
- Gavito M.E., Olsson P.A., Rouhier H., Medina-Peñafiel A., Jakobsen I., Bago A., Azcón-Aguilar C., 2005. Temperature constraints on the growth and functioning of root organ cultures with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 168, 179-188. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01481.x
- Genre A., Chabaud M., Balzergue C., Puech-Pagès V., Novero M., Rey T., Fournier J., Rochange S., Bécard G., Bonfante P., Barker D.G., 2013. Short-chain chitin oligomers from arbuscular mycorrhizal fungi trigger nuclear Ca²⁺ spiking in *Medicago truncatula* roots and their production is enhanced by strigolactone. *New Phytol.* 198, 190-202. DOI: 10.1111/nph.12146
- Genre A., Chabaud M., Faccio A., Barker D.G., Bonfante P., 2008. Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* 20, 1407-1420. DOI: 10.1105/tpc.108.059014
- Gerdemann J.W., Nicolson T.H., 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46, 235-244. DOI: 10.1016/s0007-1536(63)80079-0
- Giovannetti M., Avio L., 2002. Biotechnology of arbuscular mycorrhizas. *Appl. Mycol. Biotechnol.* 2, 275-310. DOI: 10.1016/S1874-5334(02)80014-4
- Giri B., Mukerji K.G., 2004. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: Evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza* 14, 307-312. DOI: 10.1007/s00572-003-0274-1
- González-Guerrero M., Azcón-Aguilar C., Mooney M., Valderas A., MacDiarmid C.W., Eide D.J., Ferrol N., 2005. Characterization of a *Glomus intraradices* gene encoding a putative Zn transporter of the cation diffusion facilitator family. *Fungal Genet. Biol.* 42, 130-140. DOI: 10.1016/j.fgb.2004.10.007
- Govindarajulu M., Pfeffer P.E., Jin H., Abubaker J., Douds D.D., Allen J.W., Bücking H., Lammers P.J., Shachar-Hill Y., 2005. Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* 435, 819-823. DOI: 10.1038/nature03610
- Grilli G., Urcelay C., Galetto L., Davison J., Vasar M., Saks Ü., Jairus T., Öpik M., 2015. The composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities in the roots of a ruderal forb is not related to the forest fragmentation process. *Environ. Microbiol.* 17, 2709-2720. DOI: 10.1111/1462-2920.12623
- Grime J.P., Pierce S., 2012. The evolutionary strategies that shape ecosystems. Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, Stany Zjednoczone. DOI: 10.1002/9781118223246

- Guether M., Neuhausser B., Balestrini R., Dynowski M., Ludewig U., Bonfante P., 2009. A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* 150, 73-83. DOI: 10.1104/pp.109.136390
- Gutjahr C., Parniske M., 2013. Cell and developmental biology of arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 593-617. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122413
- Gutjahr C., Radovanovic D., Geoffroy J., Zhang Q., Siegler H., Chiapello M., Casieri L., An K., An G., Guiderdoni E., Kumar C.S., Sundaresan V., Harrison M.J., Paszkowski U., 2012. The half-size ABC transporters STR1 and STR2 are indispensable for mycorrhizal arbuscule formation in rice. *Plant J.* 69, 906-920. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2011.04842.x
- Hammer E.C., Pallon J., Wallander H., Olsson P.A., 2011. Tit for tat? a mycorrhizal fungus accumulates phosphorus under low plant carbon availability. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 236-244. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01043.x
- Hart M.M., Forsythe J., Oshowski B., Bücking H., Jansa J., Kiers E.T., 2013. Hiding in a crowd - does diversity facilitate persistence of a low-quality fungal partner in the mycorrhizal symbiosis? *Symbiosis* 59, 47-56. DOI: 10.1007/s13199-012-0197-8
- Hart M.M., Reader R.J., 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 153, 335-344. DOI: 10.1046/j.0028-646X.2001.00312.x
- Harvey P.J., Campanella B.F., Castro P.M.L., Harms H., Lichtfouse E., Schäffner A.R., Smrcek S., Werck-Reichhart D., 2002. Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 9, 29-47. DOI: 10.1007/BF02987315
- Hassan S.E.D., Bell T.H., Stefani F.O.P., Denis D., Hijri M., St-Arnaud M., 2014. Contrasting the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi from hydrocarbon-contaminated and uncontaminated soils following willow (*Salix* spp. L.) planting. *PLoS One* 9, e102838. DOI: 10.1371/journal.pone.0102838
- Hegde D.M., Dwivedi B.S., Sudhakara Babu S.N., 1999. Biofertilizers for cereal production in India - a review. *Indian J. Agric. Sci.* 69, 73-83.
- Heinemeyer A., Ineson P., Ostle N., Fitter A.H., 2006. Respiration of the external mycelium in the arbuscular mycorrhizal symbiosis shows strong dependence on recent photosynthates and acclimation to temperature. *New Phytol.* 171, 159-170. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01730.x
- Heinemeyer A., Ridgway K.P., Edwards E.J., Benham D.G., Young J.P.W., Fitter A.H., 2004. Impact of soil warming and shading on colonization and community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in roots of a native grassland community. *Glob. Chang.*

- Biol. 10, 52-64. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2003.00713.x
- Hempel S., Renker C., Buscot F., 2007. Differences in the species composition of arbuscular mycorrhizal fungi in spore, root and soil communities in a grassland ecosystem. Environ. Microbiol. 9, 1930-1938. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2007.01309.x
- Hobbie E.A., 2006. Carbon allocation to ectomycorrhizal fungi correlates with belowground allocation in culture studies. Ecology. 87, 563-569. DOI: 10.1890/05-0755
- Hodgson J.G., Wilson P.J., Hunt R., Grime J.P., Thompson K., 1999. Allocating C-S-R plant functional types: a soft approach to a hard problem. Oikos. 85, 282-294. DOI: 10.2307/3546494
- Houngnandan P., Sanginga N., Okogun A., Vanlauwe B., Merckx R., Van Cleemput O., 2001. Assessment of soil factors limiting growth and establishment of *Mucuna* in farmers' fields in the derived savanna of the Benin Republic. Biol. Fertil. Soils. 33, 416-422. DOI: 10.1007/s003740100347
- Hoysted G., Jacob A., Kowal J., Giesemann P., Bidartondo M., Duckett J., Gebauer G., Rimington W., Schornack S., Pressel S., Field K., 2019. *Mucoromycotina* fine root endophyte fungi form nutritional mutualisms with vascular plants. Plant Physiol. 181, 565-577. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.19.00729>
- Huang H., Zhang S., Wu N., Luo L., Christie P., 2009. Influence of *Glomus etunicatum*/*Zea mays* mycorrhiza on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure. Soil Biol. Biochem. 41, 726-734. DOI: 10.1016/j.soilbio.2009.01.009
- Huang X., Wang L., Ma F., 2017. Arbuscular mycorrhizal fungus modulates the phytotoxicity of Cd via combined responses of enzymes, thiolic compounds, and essential elements in the roots of *Phragmites australis*. Chemosphere 187, 221-229. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.021
- Iffis B., St-Arnaud M., Hijri M., 2016. Petroleum hydrocarbon contamination, plant identity and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) community determine assemblages of the AMF spore-associated microbes. Environ. Microbiol. 18, 2689-2704. DOI: 10.1111/1462-2920.13438
- Jahromi F., Aroca R., Porcel R., Ruiz-Lozano J.M., 2008. Influence of salinity on the *in vitro* development of *Glomus intraradices* and on the *in vivo* physiological and molecular responses of mycorrhizal lettuce plants. Microb. Ecol. 55, 45-53. DOI: 10.1007/s00248-007-9249-7
- Janoušková M., Seddas P., Mrnka L., van Tuinen D., Dvořáčková A., Tollot M., Gianinazzi-Pearson V., Vosátka M., Gollotte A., 2009. Development and activity of *Glomus intraradices* as affected by co-existence with *Glomus claroideum* in one root system. Mycorrhiza 19, 393-402. DOI: 10.1007/s00572-009-0243-4
- Jansa J., Mozafar A., Anken T., Ruh R., Sanders I.R., Frossard E., 2002. Diversity and

- structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. *Mycorrhiza* 12, 225-234. DOI: 10.1007/s00572-002-0163-z
- Jansa J., Smith F.A., Smith S.E., 2008. Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytol.* 177, 779-789. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02294.x
- Jin H., Pfeffer P.E., Douds D.D., Piotrowski E., Lammers P.J., Shachar-Hill Y., 2005. The uptake, metabolism, transport and transfer of nitrogen in an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* 168, 687-696. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01536.x
- Johnsen A.R., Wick L.Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133, 71-84. DOI: 10.1016/j.envpol.2004.04.015
- Johnson N.C., Wilson G.W.T., Wilson J.A., Miller R.M., Bowker M.A., 2015. Mycorrhizal phenotypes and the law of the minimum. *New Phytol.* 205, 1473-1484. DOI: 10.1111/nph.13172
- Joner E.J., Johansen A., Loibner A.P., Cruz M.A. Dela, Szolar O.H.J., Portal J.M., Leyval C., 2001. Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. *Environ. Sci. Technol.* 35, 2773-2777. DOI: 10.1021/es000288s
- Joner E.J., Leyval C., 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2371-2375. DOI: 10.1021/es020196y
- Joner E.J., Leyval C., 2001. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* 10, 155-159. DOI: 10.1007/s005720000071
- Kalayu G., 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. *Int. J. Agron.* 917256. DOI: 10.1155/2019/4917256
- Kamel L., Tang N., Malbreil M., San Clemente H., Le Marquer M., Roux C., dit Frey N.F., 2017. The comparison of expressed candidate secreted proteins from two arbuscular mycorrhizal fungi unravels common and specific molecular tools to invade different host plants. *Front. Plant Sci.* 8, 124. DOI: 10.3389/fpls.2017.00124
- Katoh K., Kuma K.I., Toh H., Miyata T., 2005. AMFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* 33, 511-518. DOI: 10.1093/nar/gki198
- Khan A.G., Kuek C., Chaudhry T.M., Khoo C.S., Hayes W.J., 2000. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere* 41, 197-207. DOI: 10.1016/S0045-6535(99)00412-9
- Kiers E.T., Duhamel M., Beesetty Y., Mensah J.A., Franken O., Verbruggen E., Fellbaum C.R., Kowalchuk G.A., Hart M.M., Bago A., Palmer T.M., West S.A.,

- Vandenkoornhuyse P., Jansa J., Bücking H., 2011. Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 6044, 880-882. DOI: 10.1126/science.1208473
- Kirk J.L., Moutoglis P., Klironomos J., Lee H., Trevors J.T., 2005. Toxicity of diesel fuel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and *in vitro* transformed carrot root cultures. *Plant Soil* 270, 23-30. DOI: 10.1007/s11104-004-1013-x
- Klironomos J.N., Ursic M., Rillig M., Allen M.F., 1998. Interspecific differences in the response of arbuscular mycorrhizal fungi to *Artemisia tridentata* grown under elevated atmospheric CO₂. *New Phytol.* 138, 599-605. DOI: 10.1046/j.1469-8137.1998.00141.x
- Kobae Y., Tamura Y., Takai S., Banba M., Hata S., 2010. Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. *Plant Cell Physiol.* 51, 1411-1415. DOI: 10.1093/pcp/pcq099
- Koch A.M., Antunes P.M., Maherali H., Hart M.M., Klironomos J.N., 2017. Evolutionary asymmetry in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: conservatism in fungal morphology does not predict host plant growth. *New Phytol.* 214, 1330-1337. DOI: 10.1111/nph.14465
- Kohout P., Sudová R., Janoušková M., Čtvrtlíková M., Hejda M., Pánková H., Slavíková R., Štajerová K., Vosátka M., Sýkorová Z., 2014. Comparison of commonly used primer sets for evaluating arbuscular mycorrhizal fungal communities: is there a universal solution? *Soil Biol. Biochem.* 68, 482-493. DOI: 10.1016/j.soilbio.2013.08.027
- Nagahashi G., Douds D.D., Ferhatoglu Y., 2010. Functional categories of root exudate compounds and their relevance to AM fungal growth. W: H. Koltai, Y. Kapulnik (red.), *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*, s. 33-56. Springer, Dordrecht, Holandia. DOI: 10.1007/978-90-481-9489-6
- Krishnamoorthy R., Kim C.G., Subramanian P., Kim K.Y., Selvakumar G., Sa, T.M., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi community structure, abundance and species richness changes in soil by different levels of heavy metal and metalloid concentration. *PLoS One* 10, e0128784. DOI: 10.1371/journal.pone.0128784
- Krüger C., Kohout P., Janoušková M., Püschel D., Frouz J., Rydlová J., 2017. Plant communities rather than soil properties structure arbuscular mycorrhizal fungal communities along primary succession on a mine spoil. *Front. Microbiol.* 193, 970-984. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00719
- Krüger M., Krüger C., Walker C., Stockinger H., Schüßler A., 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol.* 193, 970-984. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.03962.x
- Krüger M., Stockinger H., Krüger C., Schüßler A., 2009. DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: One PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New*

- Phytol. 183, 212-223. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.02835.x
- Kumar S., Stecher G., Tamura K., 2016. Mega7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol. Biol. Evol. 33, 1870–1874. DOI: 10.1093/molbev/msw054
- Lambers H., Brundrett M.C., Raven J.A., Hopper S.D., 2011. Plant mineral nutrition in ancient landscapes: high plant species diversity on infertile soils is linked to functional diversity for nutritional strategies. Plant Soil 348:7-27. DOI: 10.1007/s11104-011-0977-6
- Lammers P.J., Jun J., Abubaker J., Arreola R., Gopalan A., Bago B., Hernandez-Sebastia C., Allen J.W., Douds D.D., Pfeffer P.E., Shachar-Hill Y., 2001. The glyoxylate cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus. Carbon flux and gene expression. Plant Physiol. 127, 1287-1298. DOI: 10.1104/pp.010375
- Latef A.A.H.A., Hashem A., Rasool S., Abd-Allah E.F., Alqarawi A.A., Egamberdieva D., Jan S., Anjum N.A., Ahmad P., 2016. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and abiotic stress in plants: a review. J. Plant Biol. 59, 407-426. DOI: 10.1007/s12374-016-0237-7
- Lee J., Lee S., Young J.P.W., 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiol. Ecol. 65, 339-349. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00531.x
- Lenoir I., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A., 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal responses to abiotic stresses: a review. Phytochemistry 123:4-15. DOI: 10.1016/j.phytochem.2016.01.002
- Lerat S., Lapointe L., Gutjahr S., Piché Y., Vierheilig H., 2003. Carbon partitioning in a split-root system of arbuscular mycorrhizal plants is fungal and plant species dependent. New Phytol. 157, 589-595. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00691.x
- Leyval C., Binet P., 1998. Effect of polyaromatic hydrocarbons in soil on arbuscular mycorrhizal plants. J. Environ. Qual. 27, 402-407. DOI: 10.2134/jeq1998.00472425002700020022x
- Li T., Hu Y.J., Hao Z.P., Li H., Wang Y.S., Chen B.D., 2013. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. New Phytol. 197, 617-630. DOI: 10.1111/nph.12011
- Liang Z., Drijber R.A., Lee D.J., Dwiekat I.M., Harris S.D., Wedin D.A., 2008. a DGGE-cloning method to characterize arbuscular mycorrhizal community structure in soil. Soil Biol. Biochem. 40, 956-966. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.11.016
- Liu A., Dalpé Y., 2009. Reduction in soil polycyclic aromatic hydrocarbons by arbuscular mycorrhizal leek plants. Int. J. Phytoremediation 11, 39-52. DOI: 10.1080/15226510802363444
- Liu M., Hulting A., Mallory-Smith C., 2017. Comparison of growth and physiological

- characteristics between roughstalk bluegrass and tall fescue in response to simulated waterlogging. *PLoS One* 12, e0182035. DOI: 10.1371/journal.pone.0182035
- Liu S.L., Luo Y.M., Cao Z.H., Wu L.H., Ding K.Q., Christie P., 2004. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environ. Geochem. Health* 26, 285-293. DOI: 10.1023/B:EGAH.0000039592.80489.e5
- López-García Á., Azcón-Aguilar C., Barea J.M., 2014. The interactions between plant life form and fungal traits of arbuscular mycorrhizal fungi determine the symbiotic community. *Oecologia* 176, 1075-1086. DOI: 10.1007/s00442-014-3091-7
- Lopez-Obando M., Ligerot Y., Bonhomme S., Boyer F.D., Rameau C., 2015. Strigolactone biosynthesis and signaling in plant development. *Development* 142, 3615-3619. DOI: 10.1242/dev.120006
- Lu Y.F., Lu M., 2015. Remediation of PAH-contaminated soil by the combination of tall fescue, arbuscular mycorrhizal fungus and epigeic earthworms. *J. Hazard. Mater.* 285, 535-541. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.07.021
- Luginbuehl L.H., Oldroyd G.E.D., 2017. Understanding the arbuscule at the heart of endomycorrhizal symbioses in plants. *Curr. Biol.* 27, 952-963. DOI: 10.1016/j.cub.2017.06.042
- Lumini E., Orgiazzi A., Borriello R., Bonfante P., Bianciotto V., 2010. Disclosing arbuscular mycorrhizal fungal biodiversity in soil through a land-use gradient using a pyrosequencing approach. *Environ. Microbiol.* 12, 2165-2179. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02099.x
- Ma W.K., Siciliano S.D., Germida J.J., 2005. a PCR-DGGE method for detecting arbuscular mycorrhizal fungi in cultivated soils. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1589-1597. DOI: 10.1016/j.soilbio.2005.01.020
- Maček I., Dumbrell, A.J., Nelson M., Fitter A.H., Vodnik D., Helgason T., 2011. Local adaptation to soil hypoxia determines the structure of an arbuscular mycorrhizal fungal community in roots from natural CO₂ springs. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4770-4777. DOI: 10.1128/AEM.00139-11
- Magurno F., Sasvári Z., Posta K., 2015. Assessment of native arbuscular mycorrhizal fungi assemblages under different regimes of crop rotation. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 13, 1215-1229. DOI: 10.15666/aeer/1304_12151229
- Maherali H., Klironomos J.N., 2007. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. *Science* 316, 1746-1748. DOI: 10.1126/science.1143082
- Maillet F., Poinot V., André O., Puech-Pagés V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martinez E.A., Driguez H., Bécard G., Dénarié J., 2011. Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* 469, 58-63. DOI: 10.1038/nature09622

- Małachowska-Jutsz A., Rudek J., Janosz W., 2011. The effect of ribwort (*Plantago lanceolata*) and its mycorrhizas on the growth of microflora in soil contaminated with used engine oil. Arch. Environ. Prot. 37, 99-113.
- Maldonado-Mendoza I.E., Dewbre G.R., Harrison M.J., 2001. a phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. Mol. Plant-Microbe Interact. 14, 1140-1148. DOI: 10.1094/MPMI.2001.14.10.1140
- Manck-Götzenberger J., Requena N., 2016. Arbuscular mycorrhiza symbiosis induces a major transcriptional reprogramming of the potato SWEET sugar transporter family. Front. Plant Sci. 7, 487. DOI: 10.3389/fpls.2016.00487
- Mantri N., Patade V., Penna S., Ford R., Pang E., 2012. Abiotic stress responses in plants: present and future. W: P. Ahmad, M. Prasad (red.) Abiotic stress responses in plants, s. 1-19. Springer, Nowy Jork, Nowy Jork, Stany Zjednoczone. DOI: 10.1007/978-1-4614-0634-1_1
- Marleau J., Dalpé Y., St-Arnaud M., Hijri M., 2011. Spore development and nuclear inheritance in arbuscular mycorrhizal fungi. BMC Evol. Biol. 11, 48. DOI: 10.1186/1471-2148-11-51
- Marquez-Garcia B., Njo M., Beeckman, T., Goormachtig S., Foyer C.H., 2014. a new role for glutathione in the regulation of root architecture linked to strigolactones. Plant, Cell Environ. 37, 488-498. DOI: 10.1111/pce.12172
- Martin C.A., Stutz J.C., 2004. Interactive effects of temperature and arbuscular mycorrhizal fungi on growth, P uptake and root respiration of *Capsicum annuum* L. Mycorrhiza 14, 241-244. DOI: 10.1007/s00572-003-0261-6
- Mathieu S., Cusant L., Roux C., Corradi N., 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi: intraspecific diversity and pangenomes. 220, 937-1336. New Phytol. DOI: 10.1111/nph.15275
- Mikkelsen B.L., Rosendahl S., Jakobsen I., 2008. Underground resource allocation between individual networks of mycorrhizal fungi. New Phytol. 180, 890-898. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02623.x
- Millar N.S., Bennett A.E., 2016. Stressed out symbiotes: hypotheses for the influence of abiotic stress on arbuscular mycorrhizal fungi. Oecologia 182, 625-641. DOI: 10.1007/s00442-016-3673-7
- Miller M.A., Pfeiffer W., Schwartz T., 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. W: 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE). Nowy Orlean, Luizjana, Stany Zjednoczone. DOI: 10.1109/GCE.2010.5676129
- Miller R.M., Jastrow J.D., 2000. Mycorrhizal fungi influence soil structure. W: Y. Kapulnik, D.D. Douds (red.), Arbuscular mycorrhizas: physiology and function, s. 3-18. Springer,

- Dordrecht, Holandia. DOI: 10.1007/978-94-017-0776-3_1
- Miransari M., 2011. Hyperaccumulators, arbuscular mycorrhizal fungi and stress of heavy metals. *Biotechnol. Adv.* 29, 645-653. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.04.006
- Moora M., Berger S., Davison J., Öpik M., Bommarco R., Bruehlheide H., Kühn I., Kunin W.E., Metsis M., Rortais A., Vanatoa A., Vanatoa E., Stout J.C., Truusa M., Westphal C., Zobel M., Walther G.R., 2011. Alien plants associate with widespread generalist arbuscular mycorrhizal fungal taxa: evidence from a continental-scale study using massively parallel 454 sequencing. *J. Biogeogr.* 38, 1305-1317. DOI: 10.1111/j.1365-2699.2011.02478.x
- Moore-Kucera J., Dick R.P., 2008. PLFA profiling of microbial community structure and seasonal shifts in soils of a Douglas-fir chronosequence. *Microb. Ecol.* 55, 500-511. DOI: 10.1007/s00248-007-9295-1
- Morgan J.A., Lecain D.R., Pendall E., Blumenthal D.M., Kimball B.A., Carrillo Y., Williams D.G., Heisler-White J., Dijkstra F.A., West M., 2011. C4 grasses prosper as carbon dioxide eliminates desiccation in warmed semi-arid grassland. *Nature* 476, 202-205. DOI: 10.1038/nature10274
- Mortimer P.E., Pérez-Fernández M.A., Valentine A.J., 2008. The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1019-1027. DOI: 10.1016/j.soilbio.2007.11.014
- Morton J.B., Redecker D., 2001. Two new families of *Glomales*, *Archaeosporaceae* and *Paraglomaceae*, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93, 181-195. DOI: 10.2307/3761615
- Mostofa M.G., Li W., Nguyen K.H., Fujita M., Tran L.S.P., 2018. Strigolactones in plant adaptation to abiotic stresses: an emerging avenue of plant research. *Plant Cell Environ.* 41, 2227-2243. DOI: 10.1111/pce.13364
- Neilson J.W., Jordan F.L., Maier R.M., 2013. Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *J. Microbiol. Methods* 920, 256-63. DOI: 10.1016/j.mimet.2012.12.021
- Newman E.I., 1966. a method of estimating the total length of root in a sample. *J. Appl. Ecol.* 3, 139-145. DOI: 10.2307/2401670
- Nichols D., Cahoon N., Trakhtenberg E.M., Pham L., Mehta A., Belanger A., Kanigan T., Lewis K., Epstein S.S., 2010. Use of ichip for high-throughput *in situ* cultivation of "uncultivable" microbial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2445-2450. DOI: 10.1128/AEM.01754-09
- Nwoko C.O., 2014. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on the physiological performance of phaseolus vulgaris grown under crude oil contaminated soil. *J. Geosci.*

- Environ. Prot. 2, 9-14. DOI: 10.4236/gep.2014.24002
- Oehl F., Sánchez-Castro I., de Sousa N.M.F., Silva G., Palenzuela J., 2015. *Dominikia bernensis*, a new arbuscular mycorrhizal fungus from a swiss no-till farming site, and *D. aurea*, *D. compressa* and *D. indica*, three new combinations in *Dominikia*. Nov. Hedwigia 101, 65-76. DOI: 10.1127/nova_hedwigia/2014/0235
- Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Mäder P., Boller T., Wiemken, A., 2003. Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. Appl. Environ. Microbiol. 69, 2816-2824. DOI: 10.1128/AEM.69.5.2816-2824.2003
- Oehl F., Sieverding E., Ineichen K., Mäder P., Wiemken A., Boller T., 2009. Distinct sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities from different agroecosystems in long-term microcosms. Agric. Ecosyst. Environ. 134, 257-268. DOI: 10.1016/j.agee.2009.07.008
- Oehl F., Sieverding E., Palenzuela J., Ineichen K., da Silva G.A., 2011. Advances in *Glomeromycota* taxonomy and classification. IAM Fungus 2, 191-199. DOI: 10.5598/ima fungus.2011.02.02.10
- Olsson P.A., 1999. Signature fatty acids provide tools for determination of the distribution and interactions of mycorrhizal fungi in soil. FEMS Microbiol. Ecol. 29, 303-310. DOI: 10.1016/S0168-6496(99)00021-5
- Öpik M., Vanatoa A., Vanatoa E., Moora M., Davison J., Kalwij J.M., Reier Ü., Zobel M., 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomeromycota*). New Phytol. 188, 223-241. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03334.x
- Ouledali S., Ennajeh M., Zrig A., Gianinazzi S., Khemira H., 2018. Estimating the contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to drought tolerance of potted olive trees (*Olea europaea*). Acta Physiol. Plant. 40, 81. DOI: 10.1007/s11738-018-2656-1
- Parniske M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nat. Rev. Microbiol. 6, 763-775. DOI: 10.1038/nrmicro1987
- Pawlowska T.E., Charvat I., 2004. Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6643-6649. DOI: 10.1128/AEM.70.11.6643-6649.2004
- Pawlowska T.E., Taylor J.W., 2004. Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. Nature 427, 733-737. DOI: 10.1038/nature02290
- Phillips T.M., Liu D., Seech A.G., Lee H., Trevors J.T., 2000. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 24, 132-139. DOI: 10.1038/sj.jim.2900789
- Pizzul L., Pilar Castillo M. Del, Stenström J., 2006. Characterization of selected

- actinomycetes degrading polyaromatic hydrocarbons in liquid culture and spiked soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 745-752. DOI: 10.1007/s11274-005-9100-6
- Płociniczak T., Fic E., Pacwa-Płociniczak M., Pawlik M., Piotrowska-Seget Z., 2017. Improvement of phytoremediation of an aged petroleum hydrocarbon-contaminated soil by *Rhodococcus erythropolis* CD 106 strain. *Int. J. Phytoremediation* 19, 614-620. DOI: 10.1080/15226514.2016.1278420
- Pozo M.J., Azcón-Aguilar C., 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:393-398. DOI: 10.1016/j.pbi.2007.05.004
- Pozo M.J., Jung S.C., López-Ráez J.A., Azcón-Aguilar C., 2010. Impact of arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant response to biotic stress: the role of plant defence mechanisms. W: H. Koltai, Y. Kapulnik (red.), *Arbuscular mycorrhizas: physiology and function*, s. 193-207. Springer, Dordrecht, Holandia. DOI: 10.1007/978-90-481-9489-6_9
- Pumplin N., Harrison M.J., 2009. Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.* 151, 809-819. DOI: 10.1104/pp.109.141879
- Qin H., Brookes P.C., Xu J., 2016. Arbuscular mycorrhizal fungal hyphae alter soil bacterial community and enhance polychlorinated biphenyls dissipation. *Front. Microbiol.* 7, 939. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00939
- Querejeta J.I., 2017. Soil water retention and availability as influenced by mycorrhizal symbiosis: consequences for individual plants, communities, and ecosystems. W: N.C. Johnson, C. Gehring, J. Jansa (red.), *Mycorrhizal mediation of soil: fertility, structure, and carbon storage*, s. 299-317. Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-804312-7.00017-6
- Rabie G.H., 2005. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of soil rhizosphere spiked with poly aromatic hydrocarbons. *Mycobiology* 33, 41-50. DOI: 10.4489/myco.2005.33.1.041
- Rajtor M., Piotrowska-Seget Z., 2016. Prospects for arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to assist in phytoremediation of soil hydrocarbon contaminants. *Chemosphere* 162, 105-116. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.07.071
- Rambaut A., 2009. Figtree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edynburg, Wielka Brytania. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>
- Rapparini F., Peñuelas J., 2014. Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth. W: M. Miransari (red.), *Use of microbes for the alleviation of soil stresses*, tom 1, s. 21-42. Springer, Nowy Jork, Nowy Jork, Stany Zjednoczone. DOI: 10.1007/978-1-4614-9466-9_2
- Ravi R.K., Walton K., Khosroheidari M., 2018. Miseq: a next generation sequencing platform for genomic analysis. W: J. DiStefano (red.), *Disease gene identification. Methods in molecular biology*, tom 176, s. 223-232. Humana Press, Nowy Jork, Nowy

- Jork, Stany Zjednoczone. DOI: 10.1007/978-1-4939-7471-9_12
- Redecker D., Hijri I., Wiemken A., 2003. Molecular identification of arbuscular mycorrhizal fungi in roots: perspectives and problems. *Folia Geobot.* volume 38, 113-124. DOI: 10.1007/BF02803144
- Reh fuss M., Urban J., 2005. *Rhodococcus phenolicus* sp. nov., a novel bioprocessor isolated actinomycete with the ability to degrade chlorobenzene, dichlorobenzene and phenol as sole carbon sources. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 695-701. DOI: 10.1016/j.syapm.2005.05.011
- Rich M.K., Nouri E., Courty P.E., Reinhardt D., 2017. Diet of arbuscular mycorrhizal fungi: bread and butter? *Trends Plant Sci.* 22, 652-660. DOI: 10.1016/j.tplants.2017.05.008
- Riley R., Charron P., Idnurm A., Farinelli L., Dalpé Y., Martin F., Corradi N., 2014. Extreme diversification of the mating type-high-mobility group (AMTA-HMG) gene family in a plant-associated arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytol.* 201, 254-268. DOI: 10.1111/nph.12462
- Rillig M.C., Mummey D.L., 2006. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 171, 41-53. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x
- Rillig M.C., Wright S.F., Nichols K.A., Schmidt W.F., Torn M.S., 2001. Large contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to soil carbon pools in tropical forest soils. *Plant Soil.* 233, 167-177. DOI: 10.1023/A:1010364221169
- Roesti D., Ineichen K., Braissant O., Redecker D., Wiemken A., Aragno M., 2005. Bacteria associated with spores of the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus geosporum* and *Glomus constrictum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6673-6679. DOI: 10.1128/AEM.71.11.6673-6679.2005
- Rohrbacher F., St-Arnaud M., 2016. Root exudation: the ecological driver of hydrocarbon rhizoremediation. *Agronomy* 6,19. DOI: 10.3390/agronomy6010019
- Ronquist F., Teslenko M., Van Der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A., Huelsenbeck J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539-542. DOI: 10.1093/sysbio/sys029
- Rosendahl S., 2008. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 178, 253-266. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02378.x
- Rosendahl S., McGee P., Morton J.B., 2009. Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Mol. Ecol.* 18, 4316-4329. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04359.x
- Rouphael Y., Franken P., Schneider C., Schwarz D., Giovannetti M., Agnolucci M., Pascale S. De, Bonini P., Colla G., 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in

- horticultural crops. *Sci. Hortic.* 196, 91-108. DOI: 10.1016/j.scienta.2015.09.002
- Ruiz-Lozano J.M., Porcel R., Azcón C., Aroca R., 2012. Regulation by arbuscular mycorrhizae of the integrated physiological response to salinity in plants: new challenges in physiological and molecular studies. *J. Exp. Bot.* 63, 4033-4044. DOI: 10.1093/jxb/ers126
- Ryszka P., Zarzyka-Ryszka M., Anielska T., Choczyński M., Turnau K., 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi from petroleum-impacted sites in the Polish Carpathians. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 138, 50-56. DOI: 10.1016/j.ibiod.2019.01.001
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nowy Jork, Stany Zjednoczone.
- Sánchez-Romera B., Ruiz-Lozano J.M., Zamarreño Á.M., García-Mina J.M., Aroca R., 2016. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and methyl jasmonate avoid the inhibition of root hydraulic conductivity caused by drought. *Mycorrhiza* 26, 111-122. DOI: 10.1007/s00572-015-0650-7
- Sanders I.R., Croll D., 2010. Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annu. Rev. Genet.* 44, 271-92. DOI: 10.1146/annurev-genet-102108-134239
- Sato K., Suyama Y., Saito M., Sugawara K., 2005. a new primer for discrimination of arbuscular mycorrhizal fungi with polymerase chain reaction-denature gradient gel electrophoresis. *Grassl. Sci.* 51, 179-181. DOI: 10.1111/j.1744-697X.2005.00023.x
- Schlaeppi K., Bender S.F., Mascher F., Russo G., Patrignani A., Camenzind T., Hempel S., Rillig M.C., van der Heijden M.G.A., 2016. High-resolution community profiling of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 212, 780-791. DOI: 10.1111/nph.14070
- Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B., Lesniewski R.A., Oakley B.B., Parks D.H., Robinson C.J., Sahl J.W., Stres B., Thallinger G.G., Van Horn D.J., Weber C.F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541. DOI: 10.1128/AEM.01541-09
- Schmidt B., Gaşpar S., Camen D., Cioban, I., Sumălan R., 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi in terms of symbiosis-parasitism continuum. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 76, 653-659
- Schnepf A., Roose T., Schweiger P., 2008. Impact of growth and uptake patterns of arbuscular mycorrhizal fungi on plant phosphorus uptake - a modelling study. *Plant Soil* 312, 85-99. DOI: 10.1007/s11104-008-9749-3
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Fungal Barcoding Consortium, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *PNAS USA* 109, 6241-6246. DOI: 10.1073/pnas.1117018109

- Schüßler A., Schwarzott D., Walker C., 2001. a new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105, 1413-1421. DOI: 10.1017/S0953756201005196
- Shahza T., Chenu C., Genet P., Barot S., Perveen N., Mougin C., Fontaine S., 2015. Contribution of exudates, arbuscular mycorrhizal fungi and litter depositions to the rhizosphere priming effect induced by grassland species. *Soil Biol. Biochem.* 80, 146-155. DOI: 10.1016/j.soilbio.2014.09.023
- Sikkema J., De Bont J.A.M., Poolman B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269, 8022-8028
- Singer A.C., Crowley D.E., Thompson I.P., 2003. Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends Biotechnol.* 21, 123-130. DOI: 10.1016/S0167-7799(02)00041-0
- Singh O.V., Jain R.K., 2003. Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 128-135. DOI: 10.1007/s00253-003-1425-1
- Sisaphaithong T., Kondo D., Matsunaga H., Kobae Y., Hata S., 2012. Expression of plant genes for arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporters and fungal vesicle formation in sorghum, barley, and wheat roots. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 76, 2364-2367. DOI: 10.1271/bbb.120782
- Slatkin M., Maddison W.P., 1990. Detecting isolation by distance using phylogenies of genes. *Genetics* 126, 249-260
- Smith F.A., Smith S.E., 2013. How useful is the mutualism-parasitism continuum of arbuscular mycorrhizal functioning? *Plant Soil* 363, 7-18. DOI: 10.1007/s11104-012-1583-y
- Smith S., Read D., 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Elsevier. DOI: 10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6
- Smith S.E., Jakobsen I., Grønlund M., Smith F.A., 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition. *Plant Physiol.* 156, 1050-1057. DOI: 10.1104/pp.111.174581
- Song Y.Y., Zeng R.S., Xu J.F., Li J., Shen X., Yihdego W.G., 2010. Interplant communication of tomato plants through underground common mycorrhizal networks. *PLoS One* 5, e13324. DOI: 10.1371/journal.pone.0013324
- Souza T., 2015. *Handbook of arbuscular mycorrhizal fungi*. Springer, Cham, Szwajcaria. DOI: 10.1007/978-3-319-24850-9
- Spatafora J.W., Aime M.C., Grigoriev I.V., Martin F., Stajich J.E., Blackwell M., 2017. The fungal tree of life: from molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiol.*

- Spectr. 5, FUNK-0053-2016. DOI: 10.1128/microbiolspec.funk-0053-2016
- Staddon P.L., Thompson K., Jakobsen I., Grime J.P., Askew A.P., Fitter A.H., 2003. Mycorrhizal fungal abundance is affected by long-term climatic manipulations in the field. *Glob. Chang. Biol.* 9, 186-194. DOI: 10.1046/j.1365-2486.2003.00593.x
- Stamatakis A., 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312-1313. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu033
- Stockinger H., Krüger M., Schüßler A., 2010. DNA barcoding of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 187, 461-474. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03262.x
- Svenningsen N.B., Watts-Williams S.J., Joner E.J., Battini F., Efthymiou A., Cruz-Paredes C., Nybroe O., Jakobsen I., 2018. Suppression of the activity of arbuscular mycorrhizal fungi by the soil microbiota. *ISME J.* 12, 1296-1307. DOI: 10.1038/s41396-018-0059-3
- Symanczik S., Al-Yahya'ei M.N., Kozłowska A., Ryszka P., Błaszczowski J., 2018. a new genus, *Desertispora*, and a new species, *Diversispora sabulosa*, in the family *Diversisporaceae* (order *Diversisporales*, subphylum *Glomeromycotina*). *Mycol. Prog.* 17, 437-449. DOI: 10.1007/s11557-017-1369-y
- Talaat N.B., Shawky B.T., 2014. Protective effects of arbuscular mycorrhizal fungi on wheat (*Triticum aestivum* L.) plants exposed to salinity. *Environ. Exp. Bot.* 98, 20-31. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2013.10.005
- Talik E., Guzik A., Małkowski E., Woźniak G., Sierka E., 2018. Biominerals and waxes of *Calamagrostis epigejos* and *Phragmites australis* leaves from post-industrial habitats. *Protoplasma* 255, 773-784. DOI: 10.1007/s00709-017-1179-8
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197
- Tedersoo L., Hansen K., Perry B.A., Kjoller R., 2006. Molecular and morphological diversity of pezizalean ectomycorrhiza. *New Phytol.* 70, 581-596. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01678.x
- Teng Y., Luo Y., Sun X., Tu C., Xu L., Liu W., Li Z., Christie P., 2010. Influence of arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* on phytoremediation by alfalfa of an agricultural soil contaminated with weathered PCBs: a field study. *Int. J. Phytoremediation* 12, 516-533. DOI: 10.1080/15226510903353120
- Tennant D., 1975. a test of a modified line intersect method of estimating root length. *J. Ecol.* 63, 995-1001. DOI: 10.2307/2258617
- Thonar C., Frossard E., Šmilauer P., Jansa J., 2014. Competition and facilitation in synthetic communities of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mol. Ecol.* 23, 733-746.

DOI: 10.1111/mec.12625

- Todeschini V., Aitlahmidi N., Mazzucco E., Marsano F., Gosetti F., Robotti E., Bona E., Massa N., Bonneau L., Marengo E., Wipf D., Berta G., Lingua G., 2018. Impact of beneficial microorganisms on strawberry growth, fruit production, nutritional quality, and volatiles. *Front. Plant Sci.* 9, 1611. DOI: 10.3389/fpls.2018.01611
- Toljander J.F., Lindahl B.D., Paul L.R., Elfstrand M., Finlay R.D., 2007. Influence of arbuscular mycorrhizal mycelial exudates on soil bacterial growth and community structure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 61, 295-304. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2007.00337.x
- Toyama, T., Furukawa T., Maeda N., Inoue D., Sei K., Mori K., Kikuchi S., Ike M., 2011. Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[a]pyrene in the *Phragmites australis* rhizosphere by bacteria-root exudate interactions. *Water Res.* 45, 1629-1638. DOI: 10.1016/j.watres.2010.11.044
- Trejo-Aguilar D., Lara-Capistrán L., Maldonado-Mendoza I.E., Zulueta-Rodríguez R., Sangabriel-Conde W., Mancera-López M.E., Negrete-Yankelevich S., Barois I., 2013. Loss of arbuscular mycorrhizal fungal diversity in trap cultures during long-term subculturing. *IAM Fungus* 4, 161-167. DOI: 10.5598/ima fungus.2013.04.02.01
- Trejo D., Moreira C., Bañuelos I., Lara L., Alafita G., Reyes A., 2013. Effect of diesel and biodiesel on the growth of *Brachiaria decumbens* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* 16, 391-398
- Treseder K.K., 2013. The extent of mycorrhizal colonization of roots and its influence on plant growth and phosphorus content. *Plant Soil* 371, 1-13. DOI: 10.1007/s11104-013-1681-5
- Trouvelot A., Kough J.L., Gianinazzi-Pearson V., 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. W: V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi (red.), *Physiological and genetical aspects of mycorrhizae*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, s. 217-221. DOI: 10.1177/004057368303900411
- Turnau K., Mesjasz-Przybyłowicz J., 2003. Arbuscular mycorrhiza of *Berkheya coddii* and other Ni-hyperaccumulating members of *Asteraceae* from ultramafic soils in South Africa. *Mycorrhiza* 13, 185-190. DOI: 10.1007/s00572-002-0213-6
- Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A.M., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35, 71-74. DOI: 10.1093/nar/gkm306
- Van Geel M., Busschaert P., Honnay O., Lievens B., 2014. Evaluation of six primer pairs targeting the nuclear rRNA operon for characterization of arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) communities using 454 pyrosequencing. *J. Microbiol. Methods* 106, 93-100. DOI: 10.1016/j.mimet.2014.08.006

- van Overbeek L.S., Saikkonen K., 2016. Impact of bacterial-fungal interactions on the colonization of the endosphere. *Trends Plant Sci.* 21, 230-242. DOI: 10.1016/j.tplants.2016.01.003
- Varela-Cervero S., López-García Á., Barea J.M., Azcón-Aguilar C., 2016. Differences in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities promoted by different propagule forms from a Mediterranean shrubland. *Mycorrhiza* 26, 489-496. DOI: 10.1007/s00572-016-0687-2
- Verdin A., Lounès-Hadj Sahraoui A., Fontaine J., Grandmougin-Ferjani A., Durand R., 2006. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza* 16, 39–405. DOI: 10.1007/s00572-006-0055-8
- Veresoglou S.D., Sen R., Mamolos A.P., Veresoglou, D.S., 2011. Plant species identity and arbuscular mycorrhizal status modulate potential nitrification rates in nitrogen-limited grassland soils. *J. Ecol.* 99, 1339-1349. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2011.01863.x
- Vestberg M., Palojärvi A., Pitkänen T., Kaipainen S., Puolakka E., Keskitalo M., 2012. Neutral lipid fatty acid analysis is a sensitive marker for quantitative estimation of arbuscular mycorrhizal fungi in agricultural soil with crops of different mycotrophy. *Agric. Food Sci.* 21, 12-27. DOI: 10.23986/afsci.4996
- Vierheilig H., Coughlan A.P., Wyss U., Piché Y., 1998. Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 5004–5007. DOI: 10.1128/aem.64.12.5004-5007.1998
- Vigneron N., Radhakrishnan G. V., Delaux P.M., 2018. What have we learnt from studying the evolution of the arbuscular mycorrhizal symbiosis? *Curr. Opin. Plant Biol.* 44, 49-56. DOI: 10.1016/j.pbi.2018.02.004
- Voets L., La Providencia I.E. de, Declerck S., 2006. *Glomeraceae* and *Gigasporaceae* differ in their ability to form hyphal networks. *New Phytol.* 172, 185-188. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01873.x
- Vosatka M., Gryndler M., Prikryl Z., 1992. Effect of the rhizosphere bacterium *Pseudomonas putida*, arbuscular mycorrhizal fungi and substrate composition on the growth of strawberry. *Agronomie* 12, 859-863. DOI: 10.1051/agro:19921021
- Walder F., Niemann H., Natarajan M., Lehmann M.F., Boller T., Wiemken A., 2012. Mycorrhizal networks: common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Physiol.* 159, 789-797. DOI: 10.1104/pp.112.195727
- Wang B., Yeun L.H., Xue J.Y., Liu Y., Ané J.M., Qiu Y.L., 2010. Presence of three mycorrhizal genes in the common ancestor of land plants suggests a key role of mycorrhizas in the colonization of land by plants. *New Phytol.* 186, 514-525. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2009.03137.x
- Wang C., Gu Z., Cui H., Zhu H., Fu S., Yao Q., 2015. Differences in arbuscular mycorrhizal

- fungus community composition in soils of three land use types in subtropical hilly area of Southern China. PLoS One 10, e0130983. DOI: 10.1371/journal.pone.0130983
- Wang E., Schornack S., Marsh J.F., Gobbato E., Schwessinger B., Eastmond P., Schultze M., Kamoun S., Oldroyd G.E.D., 2012. a common signaling process that promotes mycorrhizal and oomycete colonization of plants. Curr. Biol. 22, 2242-2246. DOI: 10.1016/j.cub.2012.09.043
- Wang E., Yu N., Bano S.A., Liu C., Miller A.J., Cousins D., Zhang X., Ratet P., Tadege M., Mysore K.S., Downie J.A., Murray J.D., Oldroyd G.E.D., Schultze M., 2014. a H⁺-ATPase that energizes nutrient uptake during mycorrhizal symbioses in rice and *Medicago truncatula*. Plant Cell 26, 1818-1830. DOI: 10.1105/tpc.113.120527
- Wang W., Shi J., Xie Q., Jiang Y., Yu N., Wang E., 2017. Nutrient exchange and regulation in arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mol. Plant. 10, 1147-1158. DOI: 10.1016/j.molp.2017.07.012
- Wang X., Zhang M., Gao J., Pu T., Bilal M., Wang Y., Zhang X., 2018. Antifungal activity screening of soil actinobacteria isolated from Inner Mongolia, China. Biol. Control 127, 78-84. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2018.07.007
- Werner G.D.A., Kiers E.T., 2015. Order of arrival structures arbuscular mycorrhizal colonization of plants. New Phytol. 205, 1515-1524. DOI: 10.1111/nph.13092
- Wewer V., Brands M., Dörmann P., 2014. Fatty acid synthesis and lipid metabolism in the obligate biotrophic fungus *Rhizophagus irregularis* during mycorrhization of *Lotus japonicus*. Plant J. 79, 398-412. DOI: 10.1111/tpj.12566
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. W: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Snisky, T.J. White (red.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, Kalifornia, Stany Zjednoczone, s. 315-322. DOI: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1
- Wipf D., Krajinski F., van Tuinen D., Recorbet G., Courty P.E., 2019. Trading on the arbuscular mycorrhiza market: from arbuscules to common mycorrhizal networks. New Phytol. 223, 1127-1142. DOI: 10.1111/nph.15775
- Wipf D., Mongelard G., van Tuinen, D., Gutierrez L., Casieri L., 2014. Transcriptional responses of *Medicago truncatula* upon sulfur deficiency stress and arbuscular mycorrhizal symbiosis. Front. Plant Sci. 5, 680. DOI: 10.3389/fpls.2014.00680
- Wright S.F., Franke-Snyder M., Morton J.B., Upadhyaya A., 1996. Time-course study and partial characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. Plant Soil 181, 193-203. DOI: 10.1007/BF00012053
- Wright S.F., Upadhyaya A., 1998. a survey of soils for aggregate stability and glomalin, a glycoprotein produced by hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Soil 198, 97-107. DOI: 10.1023/A:1004347701584

- Wu F.Y., Yu X.Z., Wu S.C., Lin X.G., Wong M.H., 2011. Phenanthrene and pyrene uptake by arbuscular mycorrhizal maize and their dissipation in soil. *J. Hazard. Mater.* 187, 341-347. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.01.024
- Wu N., Huang H., Zhang S., Zhu Y.G., Christie P., Zhang Y., 2009. Phenanthrene uptake by *Medicago sativa* L. under the influence of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Environ. Pollut.* 157, 1613-1618. DOI: 10.1016/j.envpol.2008.12.022
- Wu Q.S., Zou Y.N., Huang Y.M., 2013. The arbuscular mycorrhizal fungus *Diversispora spurca* ameliorates effects of waterlogging on growth, root system architecture and antioxidant enzyme activities of citrus seedlings. *Fungal Ecol.* 6, 37-43. DOI: 10.1016/j.funeco.2012.09.002
- Wu Q.S., Zou Y.N., Liu W., Ye X.F., Zai H.F., Zhao L.J., 2010. Alleviation of salt stress in citrus seedlings inoculated with mycorrhiza: Changes in leaf antioxidant defense systems. *Plant, Soil Environ.* 56: 470-475. DOI: 10.17221/54/2010-pse
- Xiao M., Gao Y.Z., Ling W.T., Cheng Z.X., Zeng Y.C., 2009. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on enzymes activity in soils contaminated by phenanthrene and pyrene. *China Environ. Sci.* 28, 919-924.
- Yang S.Y., Grønlund M., Jakobsen I., Grottemeyer M.S., Rentsch D., Miyao A., Hirochika H., Kumar C.S., Sundaresan V., Salamin N., Catausan S., Mattes N., Heuer S., Paszkowski U., 2012. Nonredundant regulation of rice arbuscular mycorrhizal symbiosis by two members of the *PHOSPHATE TRANSPORTER1* gene family. *Plant Cell* 24, 4236-4251. DOI: 10.1105/tpc.112.104901
- Yao Q., Gao J.L., Zhu H.H., Long L.K., Xing Q.X., Chen J.Z., 2010. Evaluation of the potential of trap plants to detect arbuscular mycorrhizal fungi using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Soil Sci. Plant Nutr.* 56, 205-211. DOI: 10.1111/j.1747-0765.2010.00444.x
- Young J.P.W., 2012. a molecular guide to the taxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 193, 823-826. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.04029.x
- Yu X.Z., Wu S.C., Wu F.Y., Wong M.H., 2011. Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *J. Hazard. Mater.* 186, 1206-1217. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.11.116
- Zhou X., Zhou J., Xiang X., Cébron A., Béguiristain T., Leyval C., 2013. Original research impact of four plant species and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on poly cyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in spiked soil. *Polish J. Environ. Stud.* 22, 1239-1245.
- Zhou X.B., Cébron A., Béguiristain T., Leyval C., 2009. Water and phosphorus content affect PAH dissipation in spiked soil planted with mycorrhizal alfalfa and tall fescue. *Chemosphere* 77, 709-13. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.08.050
- Zhu X., Song F., Xu H., 2010a. Influence of arbuscular mycorrhiza on lipid peroxidation

- and antioxidant enzyme activity of maize plants under temperature stress. *Mycorrhiza* 20, 325-332. DOI: 10.1007/s00572-009-0285-7
- Zhu X.C., Song F. Bin Xu H.W., 2010b. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on photosynthetic characteristics of maize under low temperature stress. *Chinese J. Appl. Ecol.* 21, 470-475.
- Zhu X.C., Song F.B., Liu S.Q., Liu T.D., Zhou X., 2012. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. *Plant, Soil Environ.* 58, 186-191. DOI: 10.17221/23/2011-pse
- Zwicke M., Picon-Cochard C., Morvan-Bertrand A., Prud'homme M.P., Volaire F., 2015. What functional strategies drive drought survival and recovery of perennial species from upland grassland? *Ann. Bot.* 116, 1001–1015. DOI: 10.1093/aob/mcv037